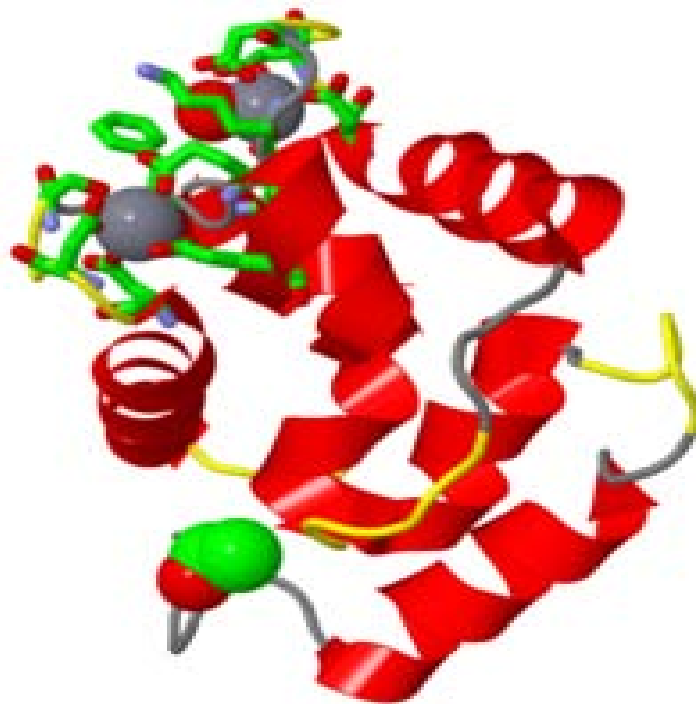




ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΑΘΗΝΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΣΕ ΨΑΡΙΑ ΤΟΥ
ΕΜΠΟΡΙΟΥ ΜΕ REAL TIME PCR (ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ)»



Δημητρίου Πολυτίμη, Α.Μ: 09104

Μενγκέζι Γκένα, Α.Μ: 09118

Επιβλέποντες καθηγητές: Δρ. Λουγκοβόης Βλαδίμηρος

Δρ. Χούχουλα Δήμητρα

ΑΘΗΝΑ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ειλικρινείς μας ευχαριστίες σε όσους συνέβαλλαν στην εκπόνηση αυτής της πτυχιακής εργασίας και συγκεκριμένα προς τον Δρ. Λουγκοβόη Βλαδίμηρο, καθηγητή του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, του Τ.Ε.Ι. Αθήνας (Τεχνολογία & Ποιότητα Ιχθυηρών, Οργανοληπτικός Έλεγχος Τροφίμων) και την Δρ. Χούχουλα Δήμητρα καθηγήτρια εφαρμογών του ΤΕΙ Αθήνας, του τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων για την καθοδήγηση και την υποστήριξη καθ' όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής, και κυρίως για την εμπιστοσύνη που μας έδειξαν.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα θέλαμε να απευθύνουμε στον κ. Παπαπαρασκευά Ιωσήφ επίκουρο καθηγητή της Ιατρικής σχολής Αθηνών για το ενδιαφέρον του και τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση ενός μέρους του πειραματικού.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	11
ΑΛΛΕΡΓΙΑ	11
2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ	11
2.2 ΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	11
2.3 ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ.....	12
2.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	12
2.5 ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ.....	13
2.6 ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑ & ΔΥΣΑΝΕΞΙΑ	14
2.7 ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΑΛΛΕΡΓΙΑ.....	15
2.8 ΠΡΟΛΗΨΗ	16
2.9 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ - ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ...	17
2.10 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ.....	19
2.11 ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΑΛΛΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ	20
2.12 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ Ε (IgE)	20
2.13 ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	24
ΙΧΘΥΗΡΑ	24
3.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΗΡΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ.....	24
3.2 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΚΑΙ ΟΦΕΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ.....	25
3.3 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	25

3.4 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ-ΜΕΤΑΛΛΑ-ΙΧΝΟΣΟΙΧΕΙΑ	26
3.5 ΛΙΠΟΣ (Ω-3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ).....	27
3.6 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΙΧΘΥΗΡΩΝ , ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	32
ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΝΑ	32
4.1 ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΝΑ ΚΑΙ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ	32
4.2 ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ	34
4.3 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	35
4.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	36
4.5 ΚΑΤΩΤΑΤΟ ΟΡΙΟ.....	38
4.6 ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	42
ΑΛΛΕΡΓΙΟΝΑ ΙΧΘΥΗΡΩΝ	42
5.1 ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ EF-hand	42
5.2 ΠΑΡΒΑΛΒΟΥΜΙΝΗ	42
5.3 ΥΠΟΛΟΙΠΑ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	53
ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	53
6.1 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	53
6.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ- ΝΕΟ ISO ΠΡΟΤΥΠΟ	55
6.3 ΚΑΤΩΤΕΡΑ ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ.....	55
6.4 ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ	56
6.5 ΚΩΔΙΚΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΠΟΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΩΝ ΚΟΙΝΗΣ ΧΡΗΣΗΣ... ..	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	61
7.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR, Polymerase Chain Reaction)	61
7.2 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ.....	62
7.3 ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ PCR.....	68
7.4 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR	68
7.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΤΗΣ PCR	69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	75
REAL TIME PCR	75
8.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	75
8.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ REAL TIME PCR	78
8.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ	83
8.4 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ PCR ΚΑΙ REAL TIME PCR	86
8.5 ΣΥΣΚΕΥΗ REAL TIME PCR - ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ.....	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	90
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΡΒΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΜΕ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	90
9.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ.....	90
9.2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	91
9.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΨΑΡΙΑ	92
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10	101
10.1 ΣΚΟΠΟΣ.....	101
10.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	102
10.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	109
10.4 REAL TIME PCR	114
10.5 ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	118
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11	120
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	120
11.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ REAL TIME PCR	120
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12	127
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	127
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13	130
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	130
13.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	130
13.2 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	130
13.3 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	134

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα θαλασσινά βρίσκονται μεταξύ των οκτώ μεγάλων ομάδων των αλλεργιογόνων που πιστεύεται ότι ευθύνονται για περισσότερο από το 90% του συνόλου των τροφικών αλλεργιών. Η παρβαλβουμίνη, μία χαμηλού μοριακού βάρους (12kDa) θερμικά σταθερή πρωτεΐνη, που δεσμεύει το ασβέστιο, αντιπροσωπεύει το κύριο αλλεργιογόνο στα ψάρια. Η υψηλή ομολογία σε αλληλουχίες αμινοξέων και οι διασταυρούμενες αντιδραστικότητες των αντισωμάτων έχουν αποδειχθεί για τις παρβαλβουμίνες σε διάφορα είδη ψαριών. Η παρβαλβουμίνη είναι εξαιρετικά πλούσια στους μυς του ψαριού, όπου παίζει ένα σημαντικό ρόλο στο εκτυλιγμένο μόριο DNA. Οι λευκοί μύες περιέχουν γενικά περισσότερη παρβαλβουμίνη από τους σκούρους μυς, γεγονός που καθιστά τους τελευταίους πολύ λιγότερο αλλεργιογόνους. Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να προσδιοριστεί ποσοτικά το αλλεργιογόνο γονίδιο της παρβαλβουμίνης σε διάφορα είδη θαλασσινών, χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου. Δείγματα από 25 είδη ψαριών, μαλακίων και μαλακοστράκων που συνήθως καταναλώνονται στην περιοχή της Μεσογείου συμπεριλήφθηκαν στην έρευνα. Το DNA εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας το εμπορικό κιτ BIOO SCIENTIFIC, μετά από ελαφρά τροποποίηση της διαδικασίας που περιγράφεται από τους κατασκευαστές. Η ενίσχυση του γονιδίου παρβαλβουμίνης με την PCR πραγματικού χρόνου διεξήχθη σύμφωνα με τη μελέτη του Min Sun et al. (2009), με κάποια τροποποίηση. Δεκαέξι από τα 25 είδη που εξετάστηκαν έδωσαν θετική ενίσχυση. Τα θετικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών (σκουμπρί, σαυρίδι, σαργός, μπαρμπούνη, λυθρίνη, μελανούρι, τσιπούρα, φαγκρί, λαβράκι, προσφυγάκι, γαύρος, σαρδέλα) και των κεφαλόποδων (σουπιά, μοσχοχτάποδο) επέδειξαν σε μεγάλο βαθμό μεταβλητά όρια, με διαφορά 12 κύκλων, παρόλο που χρησιμοποιήθηκαν ίσες ποσότητες DNA στην ενίσχυση PCR. Η τσιπούρα (*Sparus aurata*), η σαρδέλα (*Sardina pilhardus*) και το μπαρμπούνη (*Mullus sumuletus*) έδωσαν την μικρότερη τιμή (23,00) κατώτατου ορίου του κύκλου (Ct), ενώ η μαρίδα (*Spicara smaris*) και το μελανούρι (*Oblada melanura*) έδωσαν την υψηλότερη τιμή Ct (35,00), υποδεικνύοντας ότι ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου της παρβαλβουμίνης που κωδικοποιείται ποικίλλει σε διάφορα είδη ψαριών. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι αλλεργικές αντιδράσεις στα τρόφιμα είναι ιδιαίτερα ατομικές. Για μερικούς ασθενείς με υπερευαισθησία, ακόμη και ίχνη μπορούν να επιφέρουν απειλητικές για τη ζωή αλλεργικές αντιδράσεις.

ABSTRACT

The aim of this study was to quantify the parvalbumin allergen gene in various types of seafood, using real time PCR. Freshly harvested specimens from 25 species of finfish, molluscs and crustacean shellfish commonly consumed in the Mediterranean region, were included in the investigation. DNA was extracted from the samples using a commercial kit and the parvalbumin gene was amplified by real time PCR. Sixteen out of the 25 species examined yielded positive amplification. Positive samples, including several species of fish (Atlantic mackerel, horse mackerel, sheepshead, red mullet, sandsmelt, pandora, saddled sea bream, gilthead sea bream, red sea bream, European sea bass, blue whiting, anchovy, sardine) and cephalopods (cuttlefish, musky octopus), exhibited largely variable thresholds, differing by as much as 12 cycles, even though equal amounts of DNA were used in PCR amplification. Gilthead sea bream (*Sparus aurata*), sardine (*Sardina pilhardus*) and red mullet (*Mullus sumuletus*) gave the lowest mean threshold cycle (Ct) value (23.00), while picarel (*Spicara smaris*) and saddled sea bream (*Oblada melanura*) gave the highest mean Ct value (35.00), indicating that the copy number of gene-coded parvalbumin varied in different fish species. Allergic reactions to food are known to be highly individual. For some hypersensitive patients, even trace amounts can bring about life-threatening allergic reactions. The assay proved to be a potential tool for the detection and label management of fish allergens in food.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τροφή είναι βασική για την ζωή του ανθρώπου. Οι τροφές περιέχουν τις απαραίτητες θρεπτικές ουσίες (πρωτεΐνες, σάκχαρα και λίπη) για την παραγωγή ενέργειας από τα κύτταρα, από την γέννηση του ο άνθρωπος πρέπει να εισάγει στον οργανισμό του ουσίες ξένες προς αυτόν. Το ανοσοποιητικό μας σύστημα, που ελέγχει την είσοδο ξένων ουσιών για την πιθανότητα αυτές να είναι επιβλαβείς ώστε να τις εξουδετερώσει, μαθαίνει από τις πρώτες ημέρες της ζωής να μην αντιδρά στις πρωτεΐνες των τροφών (το ανοσοποιητικό σύστημα δεν αντιδρά στα σάκχαρα και τα λίπη), προκαλείται δηλαδή ανοσολογική ανοχή κάτι που είναι απαραίτητο για την επιβίωση. Σε μερικά άτομα το ανοσοποιητικό τους σύστημα δεν συμπεριφέρεται με αυτόν τον τρόπο, δηλαδή αναγνωρίζει μερικές πρωτεΐνες τροφικής προέλευσης ως απειλητικές για την υγεία του ατόμου και αντιδρά. Η αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος συνιστάται στην παραγωγή ειδικής κατηγορίας αντισωμάτων (IgE-αντισώματα) τα οποία αφενός μεν κυκλοφορούν στο αίμα και αφετέρου προσκολλώνται σε κάποια κύτταρα του αίματος (βασεόφιλα), του δέρματος και των ιστών (mastcells). Όταν το ευαισθητοποιημένο άτομο καταναλώσει πάλι την συγκεκριμένη τροφή, τότε η πρωτεΐνη-αλλεργιογόνο ενώνεται με το αντίσωμα και τα κύτταρα απελευθερώνουν κάποιες ουσίες. Η πιο γνωστή από τις ουσίες αυτές ονομάζεται ισταμίνη και μαζί με τις απελευθερωμένες ουσίες προκαλούν τα συμπτώματα της τροφικής αλλεργίας.

Τα ιχθυηρά μπορεί να είναι μία ισχυρά αλλεργιογόνος τροφή που προκαλεί περιστασιακά σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις ακόμη και θάνατο. Μερικά άτομα αλλεργικά στα ψάρια μπορεί να αντιδράσουν σε δόσεις κατάποσης πολύ χαμηλές (5 mg) είτε γάδου ή ρέγγας στο τεστ τροφικής πρόκλησης ελεγχόμενης με εικονικό φάρμακο, αν και σχετικά λίγοι ασθενείς έχουν αξιολογηθεί με τέτοιες προκλήσεις χαμηλής δόσης (Taylor et al, 2002). Το ψάρι είναι ένας γενικός όρος που αναφέρεται σε μια συλλογή από ταξινομικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των πετρόχελων, λαμπρένων, καρχαριών, σελαχιών και οστεωδών ψαριών. Τουλάχιστον 27.000 είδη ψαριών έχουν περιγραφεί επιστημονικά. Παρά την τεράστια ποικιλία των ειδών ψαριών, μόνο λίγα από την τάξη Actinopterygii καταναλώνονται συχνά, δηλαδή τα Salmoniformes, Perciformes, Gadiformes,

Pleuronectiformes, Clupeiformes και Cypriniformes. Η αλλεργία στα ιχθυηρά περιορίζει την κατανάλωση ψαριών από ορισμένα άτομα. Το ψάρι θεωρείται ως σύνηθες αλλεργιογόνο τροφίμων στις ΗΠΑ, την Ευρώπη, τον Καναδά, την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία και αλλού. Η IgE μεσολαβούμενη υπερευαισθησία στα ψάρια μπορεί να επαχθεί μέσω της κατάποσης, με άμεση επαφή και με την εισπνοή των οσμών των ψαριών και των καπνών που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος. Τα τυπικά συμπτώματα της αλλεργίας των ψαριών ποικίλλουν από δερματικά, αναπνευστικά και γαστρεντερικά έως και θανατηφόρα αναφυλαξία. Σε αντίθεση με την αλλεργία στο γάλα και το αυγό που συνήθως ξεπερνιέται, η αλλεργία στα ψάρια συχνά παραμένει ισόβια μετά την πρώτη ευαισθητοποίηση των ατόμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΛΛΕΡΓΙΑ

2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Γενικά η αλλεργία αποτελεί μια επιβλαβής αντίδραση του οργανισμού απέναντι σε μια αβλαβή ουσία, στην οποία παρεμβαίνει το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα ορίζεται ως αντίδραση υπερευαισθησίας που επάγεται μέσω ανοσολογικών μηχανισμών. Η ουσία που προκαλεί την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος, μπορεί να έχει έλθει σε επαφή με το δέρμα ή τους βλεννογόνους του σώματος, ή να είναι αποτέλεσμα κατάποσης, έγχυσης ή εισπνοής. Η αλλεργία μπορεί να επάγεται από αντισώματα ή κύτταρα. Στις περισσότερες περιπτώσεις το αντίσωμα που χαρακτηριστικά ευθύνεται για μια αλλεργική αντίδραση ανήκει στις ανοσοσφαιρίνες τάξης IgE και κατά συνέπεια τα άτομα αυτά αναφέρονται ως πάσχοντα από μία IgE-επαγόμενη αλλεργία. Οι αλλεργίες είναι παθολογικές ή υπερβολικά έντονες αντιδράσεις του συστήματος της ανοσίας και παρατηρούνται μόνο κατά την δεύτερη ή μεταγενέστερες επαφές του ατόμου με τον υπεύθυνο παράγοντα, μετά από την ευαισθητοποίηση του οργανισμού κατά την πρώτη επαφή. (Hide, 1994, Grote et al, 1998, Taylor et al, 2002)

2.2 ΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι τροφικές αλλεργίες περιλαμβάνουν ως αιτιολογικούς παράγοντες, σχεδόν αποκλειστικά, πρωτεϊνικά συστατικά των τροφίμων. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών φαίνεται ότι αποτελεί το σφαιρικό τους σχήμα. Εντούτοις δεν έχει βρεθεί κάποιο δομικό μοτίβο ή κάποιο σχέδιο αλληλουχίας αμινοξέων στην πρωτεϊνική διαμόρφωση, κοινό σε όλες της οικογένειες αλλεργιογόνων.

Γενικά ο κίνδυνος κάποια πρωτεΐνη της τροφής να επάγει αλλεργική αντίδραση, απαιτεί την ύπαρξη σημαντικών ποσοτήτων της πρωτεΐνης αυτής στο τρόφιμο που καταναλώνεται. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν τρόφιμα στα οποία η αλλεργική αντίδραση θα μπορούσε να εκδηλωθεί από αλλεργιογόνες πρωτεΐνες που βρίσκονται σε αυτά ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Επιπλέον υπάρχει πάντα ο κίνδυνος ενός κρυμμένου αλλεργιογόνου δυναμικού, ο οποίος οφείλεται σε νέες πρωτεΐνες που έχουν εισαχθεί σε συγκεκριμένο

τρόφιμο όπως στη περίπτωση των τροφών που προέρχονται από γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς.

2.3 ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ

Παρόλο που πολλά τρόφιμα εμπλέκονται στην τροφική αλλεργία, είναι σχετικά λίγα αυτά που αποδεδειγμένα προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις. Ένα άτομο μπορεί να είναι αλλεργικό σε οποιοδήποτε τρόφιμο, όπως τα φρούτα, τα λαχανικά και το κρέας, όμως αυτά δεν είναι τόσο κοινά. Τα πιο συχνά αναγνωρισμένα τροφικά αλλεργιογόνα, τα οποία ευθύνονται για το 90% όλων των τροφικών αλλεργικών αντιδράσεων, εντοπίζονται σε τρόφιμα με υψηλό πρωτεϊνικό περιεχόμενο, ειδικά στα φυτικής και θαλάσσιας προέλευσης. Σε αυτά ανήκουν το γάλα (αγελάδας, κατσίκας, σόγιας), το αυγό κότας, τα θαλασσινά [ψάρια (σολομός, τόνος, μπακαλιάρος), μαλάκια (όστρακα, σουπιές, καλαμάρια, χταπόδια), αρθρόποδα (γαρίδες, караβίδες, αστακοί)], τα όσπρια (ρεβίθια, φασόλια, φάβα, φακή, μπιζέλια), οι ξηροί καρποί (φουντούκια, αραχίδες, καρύδια, αμύγδαλα και τα έλαια τους) και τα δημητριακά (σιτάρι, ρύζι, αραβόσιτος, σίκαλη, βρώμη, κριθάρι, σόγια).

Τα τρόφιμα περιέχουν ένα πλήθος συστατικών ανάμεσα στα οποία είναι τα εδώδιμα έλαια, οι υδρολυμένες πρωτεΐνες, το άμυλο, η λακτόζη, η ζελατίνη και ενισχυτικά γεύσης. Ορισμένα από αυτά προέρχονται από πηγές που συχνά προκαλούν τροφικές αλλεργίες. Γι' αυτό τα τρόφιμα που περιέχουν αυτά τα συστατικά πρέπει να αποφεύγονται από άτομα με αλλεργίες στο τρόφιμο προέλευσης του συστατικού.

2.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη μιας τροφικής αλλεργίας είναι η κληρονομικότητα, η ύπαρξη δηλαδή ιστορικού αλλεργίας σε έναν τουλάχιστον γονέα ή αδερφό, η πρώτη επαφή του βρέφους με το αλλεργιογόνο μέσω της τροφής καθώς και το περιβάλλον στο οποίο μεγαλώνει. Η πραγματική συχνότητα της τροφικής αλλεργίας δεν είναι γνωστή. Σήμερα οι αλλεργίες στην Ελλάδα, παρουσιάζουν ανοδική τάση, σύμφωνα με νέες ανακοινώσεις της Ελληνικής Εταιρείας Αλλεργιολογίας, η οποία παρατήρησε αύξηση 50% στις αλλεργίες τα τελευταία 50 χρόνια. Μια έρευνα που έγινε σε 38.480

παιδιά από το 2009 έως το 2010 έδειξε ότι το πιο διαδεδομένο αλλεργιογόνο είναι το φυσιολογικό ακολουθούμενο από το γάλα και στη συνέχεια τα οστρακοειδή.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Asthma and Allergy Foundation, 35-40 εκατομμύρια Αμερικανών υποφέρουν από κάποια μορφή αλλεργίας. Εκτιμάται ότι 5% έως 10% εξ αυτών πάσχουν από τροφική αλλεργία. Από την άλλη πλευρά το American College of Allergists δηλώνει ότι το 25% των Αμερικανών πάσχει από πραγματικές αλλεργίες, το ήμισυ των οποίων είναι τροφικής αιτιολογίας. Το United States Department of Agriculture στην έκδοση του Federal Register, αναφέρει ότι το 15% του πληθυσμού μπορεί να είναι ευαίσθητο σε ορισμένα συστατικά των τροφών. Από όλα τα ανωτέρω είναι φανερό ότι οι τροφικές αλλεργίες κατέχουν σημαντική θέση στο ευρύ φάσμα των αλλεργικών εκδηλώσεων (Burney et al., 2014).

2.5 ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ

Μια ποικιλία εκδηλώσεων έχει αποδοθεί στην τροφική αλλεργία. Το είδος τους εξαρτάται από την ποσότητα του αλλεργιογόνου που εισάγεται στον οργανισμό ή απορροφάται, τον τύπο της αλλεργικής αντίδρασης που συμμετέχει και την ευαισθησία του οργάνου-στόχου. Άτομα πάσχοντα από τροφική αλλεργία μπορεί να εμφανίσουν ήπια και μεμονωμένα συμπτώματα μετά την κατανάλωση της συγκεκριμένης τροφής, όπως εξανθήματα, διάρροια, άσθμα. Σε πολλές περιπτώσεις τα συμπτώματα είναι οξεία και μπορούν να απειλήσουν την ζωή του ατόμου. Έτσι μετά από κατάποση αλλεργιογόνου τροφίμου από ένα άτομο με τροφική αλλεργία, το άτομο αυτό, μπορεί να βιώσει μια σοβαρή και απειλητική για την ζωή του αλλεργική αντίδραση η οποία ονομάζεται αναφυλαξία. Η φυσική πορεία των συμπτωμάτων της συστηματικής αναφυλαξίας είναι: έναρξη σε λίγα λεπτά (μπορεί σπανίως ακόμη και σε λίγα δευτερόλεπτα), κορυφώνεται σε 20-45 λεπτά και υποχωρούν πλήρως σε λίγες ώρες. Τα κύρια συστήματα που συμμετέχουν είναι το δέρμα, το αναπνευστικό και το καρδιαγγειακό. Πιο σπάνια, συμμετέχουν το πεπτικό και το ουρογεννητικό. Το επεισόδιο συνήθως ξεκινά με κνησμό σε παλάμες ή και πέλματα, αίσθημα καύσους σε όλο το σώμα ή γενικευμένο κνησμό και πρήξιμο στο πρόσωπο (χείλη, βλέφαρα). Τα συμπτώματα μεταβάλλονται σε αριθμό, ένταση και χροιά με δραματικά γρήγορο ρυθμό, που ποικίλει από άτομο σε άτομο.

2.6 ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑ & ΔΥΣΑΝΕΞΙΑ

Ο όρος «επιβλαβείς αντιδράσεις που προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων» σε έναν οργανισμό, περιλαμβάνει δύο κατηγορίες: την τροφική δυσανεξία και την υπερευαισθησία.

- Η τροφική δυσανεξία είναι μια επιβλαβής αντίδραση του οργανισμού που προκαλείται από ένα τρόφιμο λόγω των τοξικών, φαρμακολογικών και μεταβολικών αντιδράσεων του ή από τις χημικές ουσίες (συστατικά) του τροφίμου, χωρίς να συμμετέχει το ανοσολογικό σύστημα. Στην τροφική δυσανεξία εμπλέκεται η IgG και τα συμπτώματα της εμφανίζονται εντός 2-3 ημερών (Hide, 1994). Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι: α) οι φαρμακολογικές ιδιότητες ορισμένων συστατικών σε μερικά τρόφιμα που μπορεί να προκαλέσουν συμπτώματα ψευδο-αλλεργίας, όπως είναι οι αυξημένες ποσότητες τυραμίνης σε ορισμένα τυριά μακράς συντήρησης, β) η δυσανεξία στη λακτόζη, όπου η έλλειψη της β-γαλακτοσιδάσης στο λεπτό έντερο οδηγεί σε δυσαπορρόφηση της λακτόζης, προκαλώντας μετεωρισμό και διάρροια και γ) η δυσανεξία στα κουκιά, που ονομάζεται κύαμωση και είναι αποτέλεσμα της έλλειψης του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης από τον οργανισμό.
- Η τροφική υπερευαισθησία (γνωστή ως τροφική αλλεργία) αντιστοιχεί στην κλινική εκδήλωση μιας ανοσολογικής διαδικασίας κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα αντιδρά επιθετικά απέναντι σε ουσίες όπως τρόφιμα, συστατικά τους ή μεταβολικά παράγωγα τους, αναγνωρίζοντας τα ως αντίγονα και διεγείροντας την παραγωγή αντισωμάτων έναντι αυτών (Taylor et al, 1999). Συνήθως αυτή η αντίδραση είναι ακίνδυνη, διότι λανθασμένα ο οργανισμός αναγνωρίζει ως επικίνδυνα τα τρόφιμα ή τις ουσίες αυτών. Τα συμπτώματα αυτής, γίνονται αντιληπτά από το άτομο είτε μετά από 2-3 ώρες το πολύ από την κατανάλωση της τροφής. Η τροφική υπερευαισθησία περιλαμβάνει:

α) Τις αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει η ανοσοσφαιρίνη E (IgE)

β) τις αντιδράσεις στις οποίες δεν συμμετέχει.

Η κλασική αλλεργική αντίδραση αντιπροσωπεύει μόνο το 20% περίπου όλων των αλλεργικών αντιδράσεων ενώ οι τροφικές δυσανεξίες αποτελούν το υπόλοιπο 80%. Όλες οι ηλικίες είναι ευάλωτες για την εκδήλωση τροφικής αλλεργίας. Στη βρεφική, νηπιακή και

παιδική ηλικία είναι πιο συχνή η εμφάνιση της και μπορεί να φτάσει το 6% ενώ στους ενήλικες 1-2%.

2.7 ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΑΛΛΕΡΓΙΑ

Κοινές παθήσεις που οφείλονται σε αλλεργία είναι το αναφυλακτικό σοκ, το άσθμα, οι ρινίτιδες, το έκζεμα-δερματικοί κνησμοί.

- Το αναφυλακτικό σοκ ή καταπληξία είναι μια σπάνια αλλεργική αντίδραση η οποία προκαλεί στένωση των αεραγωγών και ξαφνική πτώση στην πίεση του αίματος. Προκαλείται από τσιμπήματα εντόμων (όπως μέλισσες) και από την αντίδραση του οργανισμού σε συγκεκριμένα φάρμακα (όπως η πενικιλίνη). Μπορεί να είναι θανατηφόρο εάν δεν υπάρξει άμεση ιατρική παρέμβαση. Στην αρχή μπορεί οι πάσχοντες να αισθανθούν ένα αίσθημα φαγούρας ή καψίματος στα χείλη, στο στόμα και στον λαιμό. Εν συνέχεια, τα συμπτώματα που μπορεί να ακολουθήσουν, είναι κόκκινο και ελαφρά προεξέχον εξάνθημα με φαγούρα, ωχρότητα του δέρματος και εφίδρωση. Ακόμη παρατηρούνται, πρησμένα βλέφαρα, χείλη και γλώσσα, φουσκωμένο πρόσωπο και λαιμός. Επίσης οι πάσχοντες μπορεί να αισθανθούν πόνο στην κοιλία και μερικές φορές εμετό ή διάρροια. Επιπρόσθετα μπορεί να παρατηρηθεί τάση για λιποθυμία, μη φυσιολογική υπνηλία ή απώλεια των αισθήσεων. Στα βρέφη, άρνηση να πιούν υγρά και μερικές φορές εκροή σάλιου ως συνέπεια της αδυναμία τους να καταπιούν.
- Το άσθμα είναι ασθένεια του οργανισμού κατά την οποία παρουσιάζεται έντονη δυσκολία στην αναπνοή. Οφείλεται σε αναπνευστικές δυσκολίες που προκαλούνται στιγμιαία από σπασμωδικές των λείων μυών των βρόγχων με υπερέκκριση βλέννας στις αναπνευστικές οδούς. Υπάρχουν τριών ειδών άσθματα, ένα εκ των οποίων είναι το αναφυλακτικό, γνωστό και ως άσθμα του WIDAL.
- Η αλλεργική ρινίτιδα είναι κοινή αλλεργία που προσβάλλει το άνω αναπνευστικό σύστημα, δημιουργεί φλεγμονή του βλεννογόνου της μύτης και οφείλεται σε αλλεργική αντίδραση του οργανισμού σε κάποια αλλεργιογόνα. Αυτά που προκαλούν συνήθως αλλεργική ρινίτιδα είναι το πράσινο, τα δέντρα και η γύρη από τα αγριόχορτα. Μπορεί να είναι εποχιακή, η οποία προκαλεί συμπτώματα μόνο κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού ή μπορεί να είναι χρόνια, οπότε

τα συμπτώματα εμφανίζονται όλη τη διάρκεια του έτους. Η χρόνια αλλεργική ρινίτιδα τις περισσότερες φορές προκαλείται από τη σκόνη που υπάρχει στο σπίτι, από σπόρια μούχλας (ευρωτομυκήτων) ή από νεκρά επιθηλιακά κύτταρα ζώων. Τα συμπτώματα της χρόνιας αλλεργικής ρινίτιδας είναι παρόμοια με αυτά της εποχιακής, αλλά λιγότερο έντονα. Πολλές φορές είναι κληρονομική και τα κύρια συμπτώματα της είναι αρχικά αίσθηση φαγούρας στα μάτια, στη μύτη και στο λαιμό, βουλωμένη μύτη με καταρροή και πτέρνισμα, κόκκινα, ερεθισμένα, δακρυσμένα μάτια και κάποιες φορές ξηρότητα του δέρματος.

- Η ακριβής αιτιολογία του εκζέματος δεν είναι γνωστή. Μπορεί να είναι γενετική (κληρονομική ή ενδογενής) ή να προκληθεί από κάποιο περιβαλλοντικό παράγοντα (εξωγενής) ή και από τα δύο. Τα περισσότερα εξωγενή εκζέματα προκαλούνται από ένα συνδυασμό εσωτερικών και εξωτερικών παραγόντων, έτσι μπορεί να φαίνεται ότι μερικά άτομα έχουν μια φυσική ή κληρονομική τάση να αντιδρούν σε κάποιο παράγοντα του περιβάλλοντος που σε άλλα άτομα δεν προκαλεί πρόβλημα. Ένα στα δέκα άτομα έχει έκζεμα (δερματίτιδα) σε κάποια περίοδο της ζωής του. Μπορούν να προσβληθούν όλες οι ηλικιακές ομάδες, αν και μερικοί τύποι εκζέματος είναι συνηθέστεροι σε συγκεκριμένες ηλικίες. Συνήθως, το έκζεμα εμφανίζεται στους πρώτους μήνες της ζωής, αλλά μπορεί να αναπτυχθεί οποτεδήποτε.

2.8 ΠΡΟΛΗΨΗ

Το μόνο μέτρο για την αποφυγή αλλεργικών αντιδράσεων είναι η αποφυγή κατανάλωσης τροφίμων που περιέχουν ιχθυηρά ή συστατικά αυτών. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής των τροφίμων και της προετοιμασίας των γευμάτων, απαιτείται εξαιρετική φροντίδα για να αποφευχθούν επιμολύνσεις.

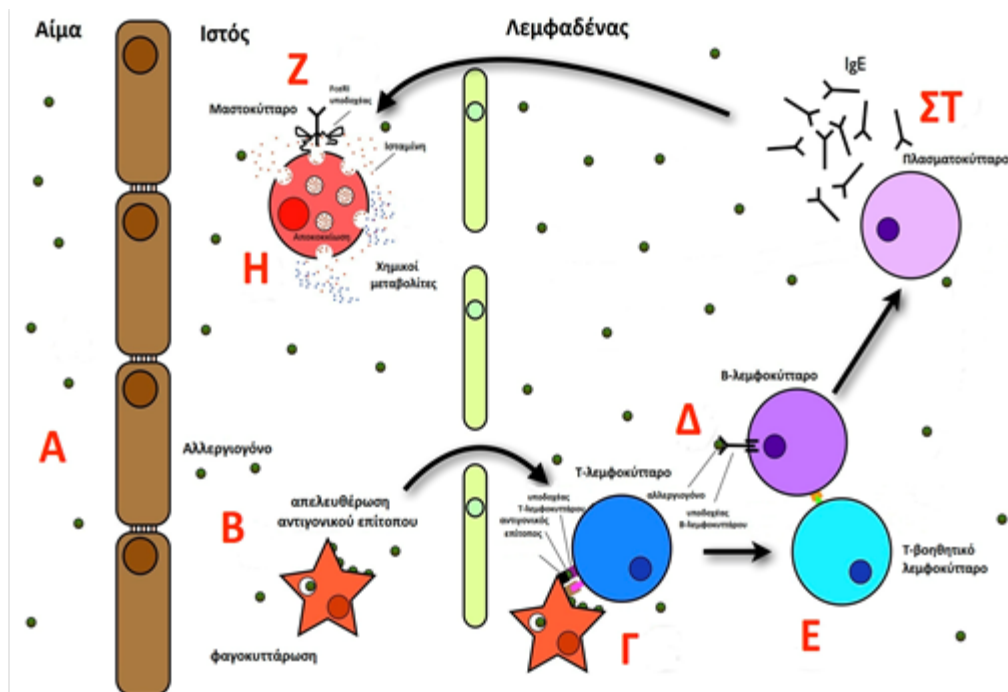
Για την ανίχνευση των ιχθυηρών στα τρόφιμα χρειάζονται αναλυτικές μέθοδοι, για να παρακολουθούνται οι τακτικοί κανόνες υγιεινής και για να επιβεβαιώνεται η συμμόρφωση με τους νόμους.

Για την ταυτοποίηση της παρβαλβουμίνης έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός διαφορετικών τεχνικών και μεθόδων όπως η χρωματογραφία, η ισοηλεκτρική εστίαση και η μαζική φασματοφωτομετρία.

2.9 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΑΣ - ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ανοσοποιητικό σύστημα αντιπροσωπεύει γραμμή άμυνας για τον οργανισμό και αποτελείται από κύτταρα, αντισώματα και άλλες χημικές ουσίες που σκοπό έχουν να προστατεύουν ορισμένα κύτταρα στόχους του οργανισμού από διάφορες διαταραχές, που μπορούν να προκληθούν από εκατομμύρια ουσίες του περιβάλλοντος όπως τα τρόφιμα. Οι ουσίες των τροφίμων που ευθύνονται για την αλλεργική αντίδραση είναι τα αλλεργιογόνα. Αυτά είναι συνήθως πρωτεϊνικής φύσεως και εισάγονται στον οργανισμό είτε από την γαστρεντερική οδό είτε από το δέρμα. Το ανοσοποιητικό σύστημα τα αντιλαμβάνεται ως ξένες ουσίες (Taylor et al, 1999). Με την είσοδο της αλλεργιογόνου ουσίας, τα μακροφάγα κύτταρα παραλαμβάνουν και φαγοκυτταρώνουν την αλλεργιογόνο πρωτεΐνη αφήνοντας έτσι ελεύθερο τον αντιγονικό επίτοπο. Στην συνέχεια τον παρουσιάζουν στην επιφάνεια των κατάλληλων Τ-λεμφοκυττάρων που έχουν την ικανότητα ανοσοαπόκρισης. Τα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα είναι πλέον ικανά να προωθήσουν τον αντιγονικό επίτοπο στα Β-λεμφοκύτταρα, τα οποία τον αντιλαμβάνονται μέσω των ειδικών πρωτεϊνικών υποδοχέων που διαθέτουν στην κυτταρική τους μεμβράνη. Έτσι τα Β-λεμφοκύτταρα διεγείρονται, αυξάνουν σε μέγεθος και διαιρούμενα μετασχηματίζονται –ωριμάζουν σε πλασματοκύτταρα. Η διαδικασία αυτή απαιτεί και την ενεργητική συμμετοχή των βοηθητικών/επαγωγικών Τ-λεμφοκυττάρων. Τα πλασματοκύτταρα παράγουν IgE αντισώματα, ειδικά στο αντιγόνο και τα εκκρίνουν στο αίμα. Οι ανοσοσφαιρίνες IgE με την σειρά τους ευαισθητοποιούν τα μαστοκύτταρα του ιστού (mastcells) μέσω των Fc υποδοχέων τους ή τα βασεόφιλα κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα. Εν συνέχεια τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα παράγουν ισταμίνη και άλλους χημικούς μεταβολιτές εγκλεισμένους σε κοκκία. Η πρώτη επαφή του οργανισμού με το αλλεργιογόνο δεν προκαλεί συμπτώματα και ονομάζεται ευαισθητοποίηση. Η επανέκθεση του οργανισμού στο ίδιο αλλεργιογόνο, επιφέρει την άμεση αλλεργική αντίδραση. Πλέον τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα που είναι ήδη ευαισθητοποιημένα (δηλαδή υπάρχουν εφοδιασμένα με IgE αντισώματα στην μεμβράνη τους και με κοκκία στο εσωτερικό τους), ενεργοποιούνται. Με εξωκύττωση, αποβάλλουν τα κοκκία, τα οποία απελευθερώνουν την ισταμίνη και τους χημικούς μεταβολιτές (π.χ βραδυκινίνη, λευκοτριένια, προσταγλανδίνες, κυτοκίνες) μέσα στο μεσοκυτταρικό χώρο. Οι εν λόγω μεσολαβητές δρουν στα αγγεία και προκαλούν διαστολή, αύξηση της διαπερατότητας και προσέλκυση κυττάρων στους ιστούς, με

κατάληξη την φλεγμονή. Τα άμεσα αποτελέσματα στο δέρμα είναι ερύθημα και οίδημα. Κατά κύριο λόγο οι τροφικές αλλεργίες διαμεσολαβούνται απο το ανοσοποιητικό σύστημα και είναι IgE-εξαρτώμενες όπως με τον μηχανισμό που προηγήθηκε. Αυτές ανήκουν στον Τύπο I αλλεργικών αντιδράσεων. Το χαρακτηριστικό των αντιδράσεων αυτών είναι ότι τα συμπτώματα τους εμφανίζονται πολύ γρήγορα μετά την έκθεση του ατόμου σε ένα αλλεργιογόνο, συνήθως μέσα σε 10-20 λεπτά. Μερικές φορές όμως μπορούν να εμφανιστούν μέσα σε λίγα λεπτά.



- Α. Είσοδος αλλεργιογόνου στον οργανισμό.
- Β. Φαγοκυττάρωση του αλλεργιογόνου και απελευθέρωση του αντιγονικού επίτοπου.
- Γ. Παρουσίαση του αντιγονικού επίτοπου στο Τ-λεμφοκύτταρο.
- Δ. Αναγνώριση του αλλεργιογόνου από τα Β_λεμφοκύτταρα.
- Ε. Ενεργοποίηση των Β-λεμφοκυττάρων μέσω των Τ-βοηθητικών λεμφοκυττάρων.

Εικόνα : Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού τροφικής αλλεργικής αντίδρασης

2.10 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας έχουν ταξινομηθεί βάση των υποκείμενων ανοσολογικών μηχανισμών τους, σε τέσσερις κατηγορίες. Ο κάθε τύπος αντίδρασης καθορίζεται από την φύση του αντιγόνου, του αντισώματος, του δραστικού κυττάρου και έμμεσα από το χρόνο της εκδήλωσής της. Σε πολλές αλλεργικές αντιδράσεις συμμετέχουν περισσότεροι του ενός ανοσολογικοί μηχανισμοί. Οι αλλεργικές αντιδράσεις μπορεί να είναι χυμικού τύπου που σημαίνει ότι γίνονται με την μεσολάβηση αντισωμάτων της κυκλοφορίας ή αντισώματα καθηλωμένα στις κυτταρικές επιφάνειες. Μπορεί όμως, οι αντιδράσεις να είναι κυτταρικού τύπου, δηλαδή γίνονται με την μεσολάβηση των ανοσολογικά αρμόδιων λεμφοκυττάρων. Κατά την ταξινόμηση οι αλλεργικές αντιδράσεις διακρίνονται σε τύπου I, II, III, IV. Οι

αντιδράσεις τύπου I γίνονται με την μεσολάβηση των IgE ανοσοσφαιρινών. Οι αντιδράσεις που περιλαμβάνουν τους άλλους τύπους των ανοσοσφαιρινών (IgM, IgG) ανήκουν στον τύπο II, αν το αντιγόνο βρίσκεται συνδεδεμένο με το κύτταρο και στον τύπο III, αν το αντιγόνο είναι ευδιάλυτο και προκαλείται ιστική βλάβη με την εναπόθεση ανοσοσυμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος. Οι αντιδράσεις τύπου IV γίνονται με την μεσολάβηση κυττάρων και θεωρούνται σαν αντιδράσεις καθυστερημένης υπερευαισθησίας (Coombs, Gell).

2.11 ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΙΔΙΑΙΤΕΡΟΤΗΤΕΣ ΑΛΛΕΡΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Οι αλλεργικές αντιδράσεις είναι ανοσολογικές αποκρίσεις διαφορετικές από τις συνηθισμένες και χαρακτηρίζονται από γρήγορη αντίδραση που καμιά φορά είναι αρκετά επικίνδυνη και βαριά για τον οργανισμό. Οι αλλεργικές αντιδράσεις εμφανίζουν ορισμένα γνωρίσματα-ιδιαιτερότητες όπως η **αύξηση των αντισωμάτων**. Τα IgE αντισώματα κανονικά είναι λίγα μέσα στο πλάσμα του αίματος, περίπου 100 mg/ml σε μάζα, ενώ τα άτομα τα οποία παρουσιάζουν αντίδραση σε κάποιο αλλεργιογόνο εμφανίζουν προοδευτικά αύξηση στα αντισώματα. Επίσης η **αύξηση μερικών μεσολαβητών της αλλεργίας** αποτελεί γνώρισμα-ιδιαιτερότητα των αλλεργικών αντιδράσεων αφού κατά την διάρκεια της αλλεργικής κρίσης εμφανίζονται μερικά μόρια στους ιστούς όπου έχει εισέλθει το αλλεργιογόνο. Τέτοιο είδος μορίου είναι η ισταμίνη, υπεύθυνη για τις φλεγμονές. Τέλος παρατηρείται δραστηριοποίηση των μαστοκυττάρων (mastcells) τα οποία βρίσκονται κυρίως στο συνδετικό ιστό και στο βλεννώδη ιστό. Περιέχουν πολλά κοκκία μέσα στα οποία υπάρχει ισταμίνη καθώς και ουσίες που παίζουν το ρόλο του μεσολαβητή για τις ενεργοποιήσεις.

2.12 ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ Ε (IGE)

Οι ανοσοσφαιρίνες ή αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες που εμφανίζουν εξειδίκευση στη σύνδεση με συγκεκριμένα αντιγόνα ή τοξίνες εισβολέων. Με τη σύνδεση αυτή το ανοσοποιητικό σύστημα επιδιώκει την εξουδετέρωση της δράσης των ανεπιθύμητων τοξινών και διευκολύνει τη φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών που φέρουν στην επιφάνειά τους το συγκεκριμένο αντιγόνο. Παράγονται από τα πλασματοκύτταρα, τα οποία είναι προϊόν διαφοροποίησης των Β-λεμφοκυττάρων. Μόλις το κατάλληλο Β-

λεμφοκύτταρο, του οποίου οι μεμβρανικοί υποδοχείς ταιριάζουν με το συγκεκριμένο αντιγόνο, έλθει σε επαφή με αυτό, ευαισθητοποιείται, πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε πλασματοκύτταρο, το οποίο εξειδικεύεται στην παραγωγή της συγκεκριμένης ανοσοσφαιρίνης. Η διαδικασία αυτή απαιτεί και την ενεργητική συμμετοχή των βοηθητικών/επαγωγικών Τα-λεμφοκυττάρων. Η πρώτη επαφή του οργανισμού με το αντιγόνο επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β-λεμφοκυττάρων, αλλά τα αντισώματα παράγονται σε σχετικά μικρές ποσότητες (ευαισθητοποίηση). Με τη δεύτερη επαφή του οργανισμού με το συγκεκριμένο αντιγόνο, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να παράγει τα αντισώματα γρηγορότερα και σε μεγαλύτερες ποσότητες. Οι ανοσοσφαιρίνες συμβολίζονται με τα γράμματα Ig (immunoglobulins). Κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης έχει μια βασικά δομή που μοιάζει με το γράμμα «Υ». Υπάρχουν 5 διαφορετικοί τύποι ανοσοσφαιρινών με βάση την δομή τους. Αυτές συμβολίζονται ως IgG, IgA, IgM, IgD και IgE. Κάθε τάξη ανοσοσφαιρίνης συμμετέχει διαφορετικά στην ανοσολογική απάντηση.

Η IgE είναι από παλιά γνωστή ως "αντιδρασίνη", της οποίας η απόδειξη υπάρξεως έγινε το 1967. Οι αντιδράσεις έχουν κυτταροφιλικότητα που σημαίνει ότι έχουν ισχυρή τάση να προσκολλώνται στα μαστοκύτταρα και στα βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα προσδίδοντάς έτσι την ιδιότητα στις IgE να ξεχωρίζουν από τις υπόλοιπες ανοσοσφαιρίνες. Στα φυσιολογικά άτομα μόνο ένα στα 10.000 μόρια ανοσοσφαιρινών του ορού ανήκει στην IgE. Αυτές οι χαμηλές συγκεντρώσεις εξηγούν τις δυσκολίες για την ανίχνευσή της. Η IgE αποτελείται από τέσσερις βασικές αλυσίδες, οι δύο βαριές ονομάζονται ε-αλυσίδες και οι δύο ελαφριές κ ή λ. έτσι η δομή της IgE περιγράφεται συνοπτικά ε2κ2 ή ε2λ2. Κυκλοφορεί σε μικρές ποσότητες στο αίμα, αλλά η παρουσία της είναι εντονότερη στους ιστούς, όπου είναι συνδεδεμένοι με υποδοχείς υψηλής συγγένειας (FcεR1) στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων (mastcells) και με υποδοχείς χαμηλής συγγένειας (FcεR2) σε ηωσινόφιλα, μακροφάγα και αιμοπετάλια. Η ανοσοσφαιρίνη E της οποίας η φυσιολογική λειτουργία είναι να προφυλάσσει το σώμα από τις μολύνσεις από τα παράσιτα είναι η κύρια υπεύθυνη για τα συμπτώματα της αλλεργίας. Ανιχνεύεται μεορό με ανοσοπροσδιορισμό και στο δέρμα με αλλεργικές δερματικές δοκιμασίες δια νυγμού.

2.13 ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ

Τα αντιγόνα είναι πρωτεϊνικά μόρια ικανά να προκαλέσουν ανοσιακή απάντηση. Τα αλλεργιογόνα είναι αντιγόνα που προκαλούν ειδικού τύπου ανοσοποιητική αντίδραση. Ειδικότερα τα μακρομόρια τους προκαλούν την σύνθεση IgE αντισωμάτων. Τα αλλεργιογόνα είναι υπεύθυνα για τις αντιδράσεις υπερευαισθησίας και ιδιαίτερα της ατοπικής αντίδρασης, που γίνεται με τη συμμετοχή IgE ανοσοσφαιρινών. Κάθε αλλεργιογόνο, μπορεί να περιγραφεί ή να ταξινομηθεί σύμφωνα με την πηγή του, την οδό έκθεσης και τη φύση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Η άνοση από ριπή γίνεται αποκλειστικά με αυτό το αντιγόνο που είναι υπεύθυνο και για την πρόκλησή της.

Τα αντιγόνα στα τρόφιμα είναι συνήθως υδατοδιαλυτές γλυκοπρωτεΐνες ή απλές πρωτεΐνες μεγάλου μεγέθους (μοριακού βάρους 10.000 έως 40.000 daltons), οι οποίες κατά κανόνα δεν διασπώνται από την υψηλή θερμοκρασία του μαγειρέματος, από τα οξέα του στομάχου και τα ένζυμα της πέψης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να διαπερνούν το βλεννογόνο του γαστρεντερικού συστήματος, να εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και να προσβάλλουν συγκεκριμένα όργανα, προκαλώντας αλλεργικές αντιδράσεις στον οργανισμό. Στα τρόφιμα υπάρχει μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών, από τις οποίες ένας μικρός αριθμός είναι αλλεργιογόνες. Σε αντίθεση με τα εισπνεόμενα αλλεργιογόνα, αυτές οι πρωτεΐνες, λαμβάνονται συχνά στον οργανισμό από το στόμα μέσω της τροφής σε πολύ μεγάλες ποσότητες (δηλαδή 10-100 g/ημέρα). Γενικά μόνο ένα μικρό τμήμα των τροφικών πρωτεϊνών απορροφάται. Ωστόσο μικρά επίπεδα μπορούν να απορροφώνται ελεύθερα και μπορούν να αναγνωρίζονται από τα Τα-λεμφοκύτταρα και ακόμα από τα IgE αντισώματα ορισμένων ατόμων. Παρόλα αυτά το μεγαλύτερο μέρος των αλλεργικών και αναφυλακτικών αποκρίσεων στις τροφές, θεωρείται ότι συσχετίζεται με τις πρωτεΐνες των τροφών που δεν έχουν υποστεί πέψη, είτε πυροδοτώντας τα μαστοκύτταρα (mastcells) στο έντερο είτε μπαίνοντας στην κυκλοφορία.

Η κατάταξη των αλλεργιογόνων γίνεται ως εξής:

- Αναπνευστικά αλλεργιογόνα ή πνευμονοαλλεργιογόνα

(αερομεταφερόμενα)

Σε αυτά υπάγονται η γύρη, τα ακάρεα της οικιακής σκόνης, οι μύκητες, οι κόκκοι των δημητριακών, τα επιθήλια και τα ούρα των ζώων, τα φτερά των πουλιών και τα έντομα.

- Πεπτικά αλλεργιογόνα

(λαμβάνόμενα)

Προέρχονται από τροφές, όπως τα θαλασσινά, τα όσπρια, τα φιστίκια, οι ξηροί καρποί, τα δημητριακά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα αυγά, τα φρούτα, οι ντομάτες, τα μανιτάρια, τα αλκοολούχα ποτά, ο καφές και η σοκολάτα.

- Φαρμακευτικά αλλεργιογόνα και ενέσιμα

Σε αυτή την κατηγορία, ανήκουν εμβόλια, σκιαγραφικά μέσα και φάρμακα. Τα πιο συνηθισμένα είναι η πενικιλίνη και τα παράγωγά της (πενικιλινοειδή & πενικιλλαμίνη), η στρεπτομυκίνη, άλλα αντιβιοτικά καθώς και άλλα φάρμακα όπως οι σουλφοναμίδες, η πυραμιδόνη κ.λ.π.

Επίσης κάθε μικροοργανισμός μπορεί να παίζει το ρόλο αλλεργιογόνου (Bredehorst R, David K 2001).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΙΧΘΥΗΡΑ

3.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΗΡΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Η κατανάλωση ιχθυηρών ήταν γνωστή και ιδιαίτερα αρεστή από την αρχαιότητα, αποτελώντας δύο βασικές πηγές, από τις οποίες ο άνθρωπος μπορούσε να αντλήσει τις απαραίτητες για την επιβίωσή του πρωτεΐνες, οι οποίες ως γνωστό αποτελούν σημαντικό διατροφικό παράγοντα. Αναλυτικότερα, γνωρίζουμε ότι τα ιχθυηρά αποτελούν τροφή άρρηκτα συνδεδεμένη με την ελληνική παράδοση, και αυτό γιατί οι Έλληνες, λόγω της μεγάλης θαλάσσιας ακτογραμμής (περίπου 16.000 km) που περιβάλλει τη χώρα, ανέκαθεν επιδίδονταν στην αλιεία, είτε για βιοποριστικούς λόγους είτε για χόμπι. Επίσης, είναι γνωστό ότι το 70% του ελληνικού πληθυσμού κατοικεί στην παράκτια ζώνη. Τα ιχθυηρά, που βρίσκονται περίπου στο μέσο της μεσογειακής τροφικής πυραμίδας, αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής μας, καθώς είναι τροφές με πλούσια διατροφική αξία και από τους διατροφολόγους συστήνεται να καταναλώνονται σε εβδομαδιαία βάση, κατά προτίμηση 1-3 φορές. Τα ψάρια είναι τροφή εύκολη και γρήγορη. Μαγειρεύονται με πολλούς και ποικίλους τρόπους στο φούρνο, στη σχάρα, στο τηγάνι, στον ατμό, στην κατσαρόλα και συνδυάζονται σχεδόν με οτιδήποτε. Άλλωστε, τα τελευταία χρόνια η τάση για μεγαλύτερη κατανάλωση αλιευμάτων αυξάνεται αλματωδώς τόσο στην Ευρωπαϊκή όσο και στην Ελληνική αγορά, λόγω της συνεχούς ανόδου του βιοτικού επιπέδου των λαών, αλλά κυρίως και της σαφούς προτίμησης του καταναλωτικού κοινού σε προϊόντα υγιεινής διατροφής.

Καλό είναι να αποφεύγονται τα ιδιαίτερα μεγάλα ψάρια, όπως ο ξιφίας, γιατί μπορεί να περιέχουν αρκετό υδράργυρο, που συσσωρεύεται στη σάρκα τους. Επίσης τα ψάρια θα πρέπει να καταναλώνονται όσο το δυνατόν πιο φρέσκα, για να μην υπάρχει υποβάθμιση των θρεπτικών συστατικών τους. Τα φρέσκα ψάρια ξεχωρίζονται, από τα κόκκινα βράγχια τους, τη χαρακτηριστική οσμή της θάλασσας και το σκληρό και άκαμπτο σώμα τους. Στα φρέσκα ψάρια, τα λέπια καθαρίζονται δύσκολα, ενώ τα μάτια τους είναι καθαρά (όχι θολά) και εξέχουν προς τα έξω.

3.2 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΚΑΙ ΟΦΕΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

Γενικά, τα ιχθυηρά αποτελούν μια πλούσια πηγή σε πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας και αμινοξέων, γνωρίζοντας ότι αυτά είναι απαραίτητα για τη δόμηση των ιστών και την αποκατάσταση των φθορών τους. Ακόμη, όμως και σε σύγκριση με το κρέας των θηλαστικών και των πτηνών, το λίπος τους είναι διαφορετικό, ανάλογα με το είδος του ψαριού. Γι' αυτό χωρίζονται σε ψάρια με χαμηλά και σε με πλούσια λιπαρά. Το λίπος τους μπορεί να είναι χαμηλό, όπως στην περίπτωση του μπακαλιάρου και της γλώσσας, που είναι 0,5-2%, ή αρκετά υψηλότερο όπως στην πέστροφα, το σολομό και το σκουμπρί, που κυμαίνεται από 10 -20 % Αλλά, ακόμα και τα πιο λιπαρά ψάρια δίνουν χαμηλό ποσό θερμίδων σε σχέση με άλλες επιλογές, όπως είναι το κοτόπουλο με δέρμα ή άλλα είδη κρέατος πλούσια σε κορεσμένο λίπος Γι' αυτό το λόγο τα ψάρια μπορούν επάξια να αντικαταστήσουν το κρέας, ως προς την πρωτεϊνική τους περιεκτικότητα. Επίσης, τα ιχθυηρά είναι πηγή πολλών βιταμινών και ιχνοστοιχείων. Επομένως, η πλούσια διατροφική τους αξία έγκειται στην περιεκτικότητά τους σε πολύτιμα για τον ανθρώπινο οργανισμό συστατικά.

3.3 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες στους ιστούς των μυών είναι το δεύτερο συστατικό σε αφθονία στα ψάρια μετά το νερό. Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από 75 έως 80% δομικών ή μυοϊνικών πρωτεϊνών (ακτίνη, μυοσίνη, τροπομυοσίνη), 10-20% σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών (αλβουμίνη, σφαιρίνη, μυοσφαιρίνη, ένζυμα), και 3% πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού (κολλαγόνο) (FAO, 2011. Sen, 2008). Η διαλυτότητα των μυϊκών πρωτεϊνών σε διαλύματα άλατος διαφέρει μεταξύ των ομάδων των πρωτεϊνών. Το κολλαγόνο είναι αδιάλυτο σε διαλύματα άλατος, ενώ οι δομικές πρωτεΐνες και οι σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες είναι διαλυτές σε υψηλή ιοντική ισχύ (0,3 έως 0,6 M) και χαμηλή ιοντική ισχύ σε διάλυμα άλατος (0,05 M), αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες ψαριών παρέχουν μια ισορροπημένη πηγή των απαραίτητων αμινοξέων. Οι πρωτεΐνες των ψαριών είναι ιδιαίτερα πλούσιες σε λυσίνη, λειτουργώντας έτσι ως ένα εξαιρετικό συμπλήρωμα διατροφής με τις πρωτεΐνες των σιτηρών που είναι ελλειπείς σε λυσίνη (FAO, 2011. Jacobsen et. al., 2010).

3.4 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ-ΜΕΤΑΛΛΑ-ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η σάρκα των ιχθυερών και κυρίως των ψαριών, χαρακτηρίζεται κατά βάση από υψηλή περιεκτικότητα πρωτεϊνών (18-25%) και πολυακόρεστα λίπη, βιταμίνες (A, B, E, D, και K), και ανόργανα άλατα, όπως το ασβέστιο, το νάτριο, το κάλιο, ο φώσφορος, ο χαλκός, ο σίδηρος, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος, το μαγνήσιο και το ιώδιο. Το ασβέστιο που περιέχουν τα ψάρια και κυρίως τα μικρά που μπορούν να καταναλωθούν με το κόκαλο (πχ. σαρδέλα, γούρνος, μαρίδα κ.λπ.), καθώς και ο φώσφορος, είναι απαραίτητα για την καλύτερη δόμηση και διατήρηση των δοντιών και των οστών. Ακόμη, ο φώσφορος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε διάφορες ορμονικές διαδικασίες. Ιδιαίτερα το μεταλλικό ιχνοστοιχείο σελήνιο, που είναι απαραίτητο για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, δηλαδή της άμυνας του οργανισμού, και το ιώδιο χρησιμοποιούνται για να είναι γερό αφενός το ανοσοποιητικό σύστημα και αφετέρου να βρίσκεται συνεχώς σε καλή λειτουργία ο θυρεοειδής αδένας. Επίσης, το σελήνιο έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, προστατεύοντας από καρδιοπάθειες και ίσως από τον καρκίνο του προστάτη.

Ψάρια όπως ο σολομός και ο ξιφίας είναι καλή πηγή βιταμίνης A, η οποία έχει άμεση σχέση με την όραση, αφού συμβάλλει στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των ματιών. Τόσο η βιταμίνη D, που είναι μεταξύ των άλλων υπεύθυνη για την αύξηση και τον εμπλουτισμό των οστών και των δοντιών, αλλά και για την απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου, όσο και η βιταμίνη A, βρίσκονται κυρίως στα λιπαρά ψάρια και στο ήπαρ πολλών από αυτά, ενώ το λάδι ορισμένων ειδών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπυκνωμένο συμπλήρωμα βιταμινών. Το πιο γνωστό συμπλήρωμα τέτοιου τύπου είναι το μουρουνέλαιο. Πέρα από τις βιταμίνες αυτές, τα ιχθυερά παρέχουν, όπως προαναφέρθηκε και άλλες βιταμίνες, όπως είναι αυτές του συμπλέγματος B, όπως B1, B2, νιασίνη (μια υδροδιαλυτή βιταμίνη του συμπλέγματος B) και B12, που είναι σημαντικές για το μεταβολισμό των βασικών διατροφικών στοιχείων, αλλά και την υγεία του νευρικού συστήματος, την καλή λειτουργία του μεταβολισμού, την πρόληψη κατά των αναιμιών που σχετίζονται με τα ερυθροκύτταρα του αίματος, καθώς και την καλή υγεία και εμφάνιση του δέρματος και των μαλλιών μας.

3.5 ΛΙΠΟΣ (Ω-3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ)

Τα τελευταία χρόνια υπήρξε μεγάλο ενδιαφέρον για τα λίπη των ψαριών τα οποία είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, γνωστά ως ω-3, που είναι απαραίτητα για τον οργανισμό, καθώς προλαμβάνουν και αντιμετωπίζουν αρκετές ασθένειες, όπως για παράδειγμα ορισμένες ανωμαλίες του ανοσοποιητικού συστήματος, τον καρκίνο του μαστού ή του προστάτη κ.ά. Είναι γνωστό ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά, όταν είναι ενταγμένα σε ένα ισορροπημένο διαιτολόγιο, συντελούν στη μείωση της ολικής και της «κακής» χοληστερίνης, καθότι έχουν αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές ιδιότητες. Ως επακόλουθο έχουν την εμπόδιση εμφάνισης αρρυθμιών και αθηροσκλήρωσης, συμβάλλουν κυρίως στη μείωση της αρτηριακής πίεσης και φαίνεται να δρουν προστατευτικά έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Επίσης, παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες οι οποίες σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων και είναι πολύ απαραίτητα, καθώς τροφοδοτούν τον εγκέφαλο σε περιόδους πνευματικής καταπόνησης, αυξάνουν τη συγκέντρωση και την ψυχοκινητική εξέλιξή του και οξύνουν τα αντανακλαστικά. Επίσης, πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα φαίνεται να έχουν αντικαταθλιπτική δράση και να βοηθούν στην αντιμετώπιση των αρθριτίδων (π.χ οστεοαρθρίτιδα) και της σκλήρυνσης κατά πλάκα, ενισχύουν και την ικανότητα μάθησης, συγκέντρωσης και μνήμης, ενώ σχετίζονται με την εγκυμοσύνη και το δείκτη νοημοσύνης του νεογνού. Πιο πλούσια σε ω-3 λιπαρά, είναι φυσικά τα πιο λιπαρά ψάρια όπως είναι ο σολομός, το σκουμπρί, ο τόνος, η σαρδέλα, ο κολιός, η ρέγκα, ο γαύρος, το χέλι, η πέστροφα κ.ά. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα για την υψηλή βιολογική και διαιτητική αξία των ιχθυηρών είναι οι Εσκιμώοι, όπου η διατροφή τους στηρίζεται κυρίως στην κατανάλωση ψαριών, οι οποίοι είναι από τους υγιέστερους πληθυσμούς του πλανήτη.

3.6 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΙΧΘΥΗΡΩΝ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ

Τα ψάρια ορίζονται ως ποικιλόθερμα, υδρόβια, χορδωτά με υποτυπώδη άκρα που αναπτύχθηκαν σαν πτερύγια, με βράγχια που αποτελούν τα κύρια όργανα του αναπνευστικού συστήματος και λέπια που καλύπτουν το σώμα. Εναλλακτικά, ένα ψάρι είναι απλά ένα υδρόβιο σπονδυλωτό με βράγχια και άκρα στο σχήμα των πτερυγίων. Μέχρι σήμερα είναι γνωστά 27.977 είδη ζώντων ψαριών που ανήκουν σε 515 οικογένειες και 62 τάξεις, τα οποία έχουν έγκυρες επιστημονικές ονομασίες (Helfman et al., 2009). Από αυτά τα είδη, οι οστεϊχθύες αντιπροσωπεύουν πάνω από 26.000 είδη, ενώ το υπόλοιπο

είναι τα ψάρια χωρίς γνάθο, οι καρχαρίες, τα σελάχια, και οι χίμαιρες (Helfman et al., 2009).

Τα ψάρια είναι μέρος του βασιλείου Animalia, της συνομοταξίας των Χορδωτών και του υποφύλου των Σπονδυλωτών. Η υπερκλάση των ψαριών περιλαμβάνει τρεις κλάσεις, τα Agnatha (λάμπραινα και πετρόχελο), τους Chondrichthyes (χονδριχθύες, όπως καρχαρίες και σαλάχια) και τους Osteichthyes (ψάρια με οστέινο σκελετό). Η τελευταία ομάδα περιλαμβάνει τις υποκατηγορίες Sarcopterygii (ψάρια με σαρκώδη πτερύγια) και Actinopterygii (ψάρια με ακτινωτά πτερύγια) (O'Neil et al., 1993. Regenstein, 1991). Η τάξη των αγνάθων είναι η πιο πρωτόγονη και αντιπροσωπεύει το βασικό γνώρισμα της απουσίας σιαγόνων (Λουγκοβόης, 2002). Σε αντίθεση με τα άγναθα, οι χονδριχθύες και οι οστεϊχθύες έχουν σαγόνια για το μάσημα της τροφής και την άμυνα από τα αρπακτικά. Τα ψάρια που καταναλώνονται και έχουν εμπορική σημασία έχουν ως επί το πλείστον κατηγοριοποιηθεί στα ακτινοπτερύγια, τα οποία περιλαμβάνουν περίπου 20.000 είδη. Παρά την ποικιλία των ειδών των ψαριών, λίγες μόνο τάξεις των ψαριών καταναλώνονται συνήθως, δηλαδή τα Salmoniformes (σολομός, πέστροφα, λευκίσκος), τα Perciformes (πέρκα, λυθρίνι, τόνος, σκουμπρί, τιλάπια), τα Gadiformes (γάδος, μπακαλιάρος, μερλούκιος), τα Pleuronectiformes (γλώσσα, πλευρονήκτης), τα Clupeiformes (ρέγκα, σαρδέλα, γαύρος), και τα Cypriniformes (κυπρίνοι) (O'Neil et al., 1993).

Τα κύρια συστατικά στα εδώδιμα μέρη τόσο των γλυκών νερών όσο και των θαλάσσιων ψαριών περιλαμβάνουν νερό, πρωτεΐνες, λιπίδια και ανόργανα άλατα (τέφρα), που εκτιμούνται σε 60-80%, 18-20%, 0,5 έως 19% και 1% αντίστοιχα (Sen, 2005). Τα ψάρια περιέχουν πολύ μικρές ποσότητες υδατανθράκων που είναι αποθηκευμένοι με τη μορφή γλυκογόνου στο ήπαρ ή στους μυϊκούς ιστούς. Η χημική σύνθεση των ψαριών εξαρτάται από το γένος και το είδος. Η ηλικία, το μέγεθος, το φύλο και η σεξουαλική ωριμότητα, αναλόγως του περιβάλλοντος και της αλιευτικής περιόδου επηρεάζει τη σύνθεση των ψαριών ακόμα και εντός του ίδιου είδους (Sen, 2005). Η χημική σύνθεση των ιχθύων διαφέρει από τα χερσαία ζώα και σχετίζεται με την παρουσία μιας υψηλής περιεκτικότητας σε μη πρωτεϊνικό άζωτο, όπως το οξειδίο της τριμεθυλαμίνης (TMAO), την αμμωνία, την ταυρίνη και την ουρία. Επιπλέον, το λίπος των ψαριών περιέχει υψηλές ποσότητες Ω-3 λιπαρών οξέων που είναι ευπαθή σε ταχεία τάγκιση. Τέλος, η χαμηλή περιεκτικότητα

γλυκογόνου έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη μεταθανάτια πτώση του pH που παραμένει σχετικά υψηλό, 6,0 έως 6,7 (Jacobsen et al., 2010).

Τα ιχθυηρά αποτελούν βασικά προϊόντα διατροφής που μπορεί να καταναλωθούν και να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες μορφές. Το 2008, υπολογίζεται ότι σχεδόν 81% της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυηρών (115 εκατομμύρια τόνοι) καταναλώθηκαν από τον άνθρωπο, ενώ το υπόλοιπο 19% (27 εκατομμύρια τόνοι) χρησιμοποιήθηκε για μη βρώσιμους σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ιχθυάλευρων και ιχθυελαίων, καθώς και για φαρμακευτικές χρήσεις (FAO, 2008). Τα ιχθυηρά είναι ιδιαίτερα ευπαθή τρόφιμα που απαιτούν κατάλληλη διαχείριση, διατήρηση και μεταποίηση. Σε γενικές γραμμές, αυτά διανέμονται με τις εξής μορφές: ζωντανά, νωπά, διατηρημένα με απλή ψύξη, κατεψυγμένα, θερμικά επεξεργασμένα, ζυμωμένα, λυοφιλομεμένα, αποξηραμένα, καπνιστά, παστά, μαρινάτα, βραστά, τηγανητά, με τη μορφή ιχθυοκιμά, σε σκόνη ή σε κονσέρβα.

Από τα ιχθυηρά που χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, τα ζώντα ή φρέσκα ιχθυηρά είναι το πιο σημαντικό προϊόν που διατίθεται στο εμπόριο (49,1%), ακολουθούμενα από τα κατεψυγμένα ιχθυηρά (25,4%), τα παρασκευασμένα ή διατηρημένα ιχθυηρά μέσω της κονσερβοποίησης (15,0%) και τα αλίπαστα ιχθυηρά, μέσω αλατίσματος, ξήρανσης, ή κάπνισης (10,6 %) (FAO, 2008). Στις Η.Π.Α., τα φιλέτα αντιπροσωπεύουν τα πιο σημαντικά προϊόντα σε νωπά ή κατεψυγμένα ψάρια, όσον αφορά την αξία και τον παραγόμενο όγκο. Ο γάδος και ο μπακαλιάρος της Αλάσκας είναι τα κοινά είδη που χρησιμοποιούνται για τα νωπά ή κατεψυγμένα φιλέτα. Φιλέτα βενθικών ψαριών, όπως ο γάδος και ο μπακαλιάρος μεταξύ άλλων χρησιμοποιούνται για την παραγωγή κατεψυγμένων blocks, τα οποία κόβονται σε διαφορετικά σχήματα για την παρασκευή παναρισμένων αλιευτικών προϊόντων (fish fingers, fish sticks). Μεγαλύτερα ψάρια, συμπεριλαμβανομένου του πλευρονήκτη, του ξιφία, του σολομού και του τόνου, είναι συνήθως αυτά που υποβάλλονται σε επεξεργασία για την παραγωγή φιλέτων ψαριού (Corey, 2001).

Η ποιότητα των ψαριών επιδεινώνεται ραγδαία μετά την αλίευση λόγω της αλλοίωσης που προκαλείται από ενζυμικές, χημικές και βακτηριακές δράσεις. Για να παραταθεί η διάρκεια ζωής και να αναπτύξουν επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητες, τα ψάρια υποβάλλονται σε

διάφορες μορφές επεξεργασίας όπως η κονσερβοποίηση, το αλάτισμα, η ξήρανση και το κάπνισμα. Η κονσερβοποίηση χρησιμοποιεί τη θερμότητα για την αδρανοποίηση όλων των μικροβιακών επιμολύνσεων και ακολουθείται από τη συσκευασία του προϊόντος σε ερμητικά σφραγισμένα δοχεία για να αποφευχθεί νέα μόλυνση. Τα κοινά ψάρια για κονσερβοποίηση είναι ο γαύρος, οι σαρδέλες, ο τόνος και ο σολομός. Σε αντίθεση με τις σαρδέλες, τον τόνο και τον σολομό που υπόκεινται σε θερμική επεξεργασία, οι αντσούγιες συσκευάζονται ολόκληρες σε αλάτι και αφήνονται να ωριμάσουν πριν από τη συσκευασία με λάδι και τη σφράγιση. Δεδομένου ότι δεν εμπλέκεται θέρμανση του προϊόντος, οι αντσούγιες έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής από άλλα αλιευτικά προϊόντα (Hall, 2011a).

Η επεξεργασία με αλάτι ή / και καπνό αυξάνει τη διάρκεια ζωής των ψαριών με την απομάκρυνση του νερού (ξηράνση και κάπνισμα) ή τη διάχυση διαλυτών ουσιών στο προϊόν (αλάτισμα), οδηγώντας σε αύξηση της περιεκτικότητας σε διαλυτά στερεά σε ένα επίπεδο που εμποδίζει την ανάπτυξη των οργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στο προϊόν. Η αποξήρανση των ψαριών περιλαμβάνει είτε αφυδάτωση σε ρεύμα αέρα ή ξήρανση με κατάψυξη για την απομάκρυνση της υγρασίας (Sikorski & Ruiter, 1994). Καπνιστά προϊόντα ψαριών μπορούν να παραχθούν είτε με ψυχρό κάπνισμα που λαμβάνει χώρα κάτω από ΨΘή με θερμό κάπνισμα που γίνεται κυρίως στους 70-100°C. Παραδείγματα ψυχρού καπνιστού ιχθυηρού είναι η ρέγκα, ο καπνιστός σολομός και ο μπακαλιάρος, τα οποία συχνά μαγειρεύονται πριν καταναλωθούν (Hall, 2011b). Το αλάτισμα των ιχθυηρών μπορεί να λάβει τη μορφή ξηρής αλάτισης με ανάμειξη των ψαριών με ξηρό άλας ή υγρής αλάτισης με εμβάπτιση σε άλμη (Sikorski & Ruiter, 1994).

Βελτιωμένες τεχνολογίες επεξεργασίας αυξάνουν τη χρήση των ιχθυηρών ως συστατικό σε πολλές εφαρμογές. Η ζελατίνη ψαριού προέρχεται από το κολλαγόνο που λαμβάνεται από δέρμα ψαριών και τα οστά των διαφόρων ειδών ιχθύων, όπως ο γάδος, ο μπακαλιάρος, ο τόνος, η πέρκα, τα καλκάνια, η τιλάπια και το κοκκινόψαρο (Taylore et al., 2004). Η παραγωγή της ζελατίνης ψαριών περιλαμβάνει θέρμανση του κολλαγόνου με την παρουσία οξέος ή αλκάλειου, το οποίο διασπά τις ενδο και διαμοριακές ομοιοπολικές διασυνδέσεις στο κολλαγόνο και το μετατρέπει σε διαλυτή ζελατίνη. Η ζελατίνη ιχθύος χρησιμοποιείται ως πυκνωτικό μέσο ή σταθεροποιητής, για την μικροενθυλάκωση των βιταμινών και άλλων φαρμακευτικών προσθέτων, ως ένας φορέας για γεύσεις και χρωστικές και ως τεχνολογικό βοήθημα στη μεταποίηση για την παραγωγή ποτών (Karim & Bhat, 2009).

Η ιχθυόκολλα είναι μια καθαρή μορφή κολλαγόνου που προέρχεται από αποξηραμένες κύστες των τροπικών και υποτροπικών ψαριών, όπως ο οξύρρυγχος και το γατόψαρο (Weber et al., 2010). Η νηκτική κύστη είναι ένας συμπιεσμένος σάκος αέρα, που βρίσκεται στην κοιλιακή κοιλότητα κάτω από τη σπονδυλική στήλη και η λειτουργία της είναι να ρυθμίζει το ειδικό βάρος του ψαριού, που επιτρέπει στο ψάρι να διατηρήσει την θέση του σε οποιοδήποτε επίπεδο στο νερό. Η ιχθυόκολλα παράγεται μέσω της κοκκοποίησης της αποξηραμένης νηκτικής κύστης, ακολουθούμενη από πλύση, αποστείρωση με αραιό υπεροξείδιο του υδρογόνου και ξέπλυμα. Η θερμοκρασία διατηρείται στους -15°C για την πρόληψη της μετουσίωσης του κολλαγόνου τριπλής έλικας στις τυχαίες σπείρες της ζελατίνης, η οποία καθιστά το κολλαγόνο αναποτελεσματικό ως διαυγαστικό παράγοντα. Η ιχθυόκολλα είναι διαθέσιμη σε μορφή σκόνης, πάστας ή πολύ παχύρρευστου υγρού (FSANZ, 2009.) Η κύρια εφαρμογή της ιχθυόκολλας είναι η χρήση της ως διαυγαστικός παράγοντας στη βιομηχανία οινοπνευματωδών ποτών με τον εγκλωβισμό και την άθροιση κυττάρων ζύμης, πρωτεϊνών και πολυφαινολικών ενώσεων (FSANZ, 2009). Η ιχθυόκολλα συμβάλλει επίσης στις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού, αποτρέπει την πρωτεϊνογενή ομίχλη και βελτιώνει την απόδοση διήθησης (Weber et al., 2009). Η μύρα ή το κρασί περιέχουν συνήθως χαμηλά επίπεδα καταλοίπων της ιχθυόκολλας και απομακρύνεται από το τελικό προϊόν με καθίζηση, διήθηση ή φυγοκέντριση (FSANZ, 2009).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΝΑ

4.1 ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΝΑ ΚΑΙ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ

Από τα αρχαία χρόνια η θάλασσα ήταν μία μεγάλη πηγή προϊόντων διατροφής για τον ανθρώπινο πληθυσμό. Το 1994 ο όγκος των αλιευμάτων προς εμπορική εκμετάλλευση ξεπέρασε τα 100 εκ. τόνους. Επιπρόσθετα με την εμπορική αλιεία η ιχθυοκαλλιέργεια προμηθεύει ένα συνεχώς αυξανόμενο ποσό θαλασσινών προϊόντων όπως το λυκόψαρο (γουλιανός), η γαρίδα και ο σολομός. Η διαρκώς αυξανόμενη εκμετάλλευση των θαλάσσιων πόρων, καθώς και η ιχθυοκαλλιέργεια, συσχετίζονται άμεσα με την ολοένα αυξανόμενη κατανάλωση των θαλασσινών ειδών, ειδικότερα την τελευταία δεκαετία. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το 1997 η κατά κεφαλή κατανάλωση θαλασσινών στις Η.Π.Α. ήταν 14,6 λίβρες, και ο καταναλωτικός τζίρος των θαλασσινών ξεπέρασε τα 38 δισεκατομμύρια δολάρια, τα περισσότερα από τα οποία δαπανήθηκαν σε εγκαταστάσεις υπηρεσιών τροφίμων. Το σύνολο των βρώσιμων θαλασσινών μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις διαφορετικές μεγάλες ομάδες οργανισμών, τα Χορδωτά, τα Μαλάκια και τα Αρθρόποδα, καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά γένη. Η μεγαλύτερη συνομοταξία των Χορδωτών είναι οι Οστεϊχθύες. Τα Μαλάκια περιλαμβάνουν τα σαλιγκάρια (γαστερόποδα), τις αχιβάδες, τα μύδια, τα στρείδια, τα χτένια (δίθυρα), τα καλαμάρια και τα χταπόδια (κεφαλόποδα). Τα αρθρόποδα περιλαμβάνουν τη μεγάλη τάξη των καρκινοειδών, η οποία περιλαμβάνει τις γαρίδες, τους αστακούς και τις καραβίδες.

Με την εξέλιξη νέων τεχνολογικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης της βελτίωσης των μεταφορών και της συντήρησης, τα φρέσκα θαλασσινά είναι πιο ευρέως διαθέσιμα σε περιοχές οι οποίες είναι μακριά από την τοποθεσία όπου αυτά μεγάλωσαν και συλλέχθηκαν. Επιπλέον, παρασκευάσματα όπως το surimi (πρωτεΐνη που προέρχεται από τον μπακαλιάρo της Αλάσκας) έχουν χρησιμοποιηθεί ως βάση για την παρασκευή διαφόρων προϊόντων τροφίμων όπως προϊόντα απομίμησης καβουρόψιχας, λουκάνικα, γαρίδες, σάλτσες και αρωματικές ύλες. Επομένως η κατανάλωση και η έκθεση σε αυτού του είδους τις πρωτεΐνες των θαλασσινών μπορεί να μην είναι πάντοτε εμφανής στους καταναλωτές που είναι αλλεργικοί σε τέτοιες τροφές. Αλλεργικές αντιδράσεις μπορούν και

όντως αναπτύσσονται σε θαλασσινά προϊόντα (Taylor & Bush, 1988). Αξιολογώντας μελέτες που έγιναν στο εργαστήριο για αλλεργίες που προκαλούνται από θαλασσινά, σε 30 άτομα ευαίσθητα σε γαρίδες και 37 άτομα ευαίσθητα σε ψάρια έδειξαν ότι η πιο συχνά καταγραφόμενη ένδειξη είναι ο κοινός κνησμός (ο οποίος κυμαίνεται από 69% έως 90%). Η ανάπτυξη εξανθημάτων παρατηρήθηκε στο 69% των περιπτώσεων, ενώ περισσότερο από το μισό των πληθυσμών (51% και 52% αντίστοιχα) σημείωσε πρήξιμο στα χείλη και στη γλώσσα. Περίπου το 50% των δύο ομάδων παρουσίασε συμπτώματα εμφυσήματος, γαστρεντερικά συμπτώματα και αναφυλακτικά σοκ (O' Neil et al., 1993. Daul et al., 1988, 1993a, 1993b). Συνεπώς οι τροφικές αλλεργικές αντιδράσεις που προκαλούνται από την κατανάλωση θαλασσινών είναι τυπικές αντιδράσεις οι οποίες σημειώνονται και σε πληθώρα άλλων προϊόντων που προκαλούν αλλεργίες.

Επιπροσθέτως, περιστατικά αλλεργιών που σχετίζονται με διάφορους επαγγελματικούς τομείς έχουν εντοπιστεί σε ψαράδες, εργάτες σε βιομηχανίες ψαριών, σε κονσερβοποιεία, μάγειρες εστιατορίων και διαφόρων άλλων εργατών οι οποίοι σχετίζονται με τους διάφορους τομείς της βιομηχανίας θαλασσινών και προϊόντων θαλασσινών (Cartier et al., 1984, 1986; Desjardins et al., 1995. Lemiere et al., 1996. O' Neil & Lehrer, 1996). Μία από τις πλέον μελετημένες βιομηχανίες όσο αναφορά την εμφάνιση αλλεργιών στην εργασία είναι αυτή που αφορά τον κάβουρα της Αρκτικής. Μελέτες των Cartier και Malo έχουν δείξει ότι οι εργάτες αυτής της βιομηχανίας ήταν εκτεθειμένοι σε αλλεργιογόνα μέσω άμεσης επαφής με προϊόντα θαλασσινών όπως και με την εισπνοή σκόνης από τα προϊόντα ή από την έκθεση σε σταγονίδια τα οποία είχαν παραχθεί κατά την επεξεργασία των προϊόντων. Στην αρχική τους έκθεση, από τους 303 εργάτες που παρακολουθήθηκαν παραπάνω από το 1/3 παρουσίασε άσθμα ενώ ποσοστό 18% αναφέρθηκε ότι έπασχαν από ρινίτιδα και ρινική συμφόρηση και περίπου 24% σημείωσε κάποιο είδος δερματικού κνησμού (Cartier et al., 1984).

Τόσο στους καταναλωτές όσο και στους εργάτες της βιομηχανίας οι αντιδράσεις αυτές οφείλονται στη δημιουργία των αντισωμάτων IgE. Η IgE είναι ένας τύπος ορού ανοσοσφαιρίνης η οποία είναι υπεύθυνη για τις αντιδράσεις άμεσης υπερευαισθησίας τύπου 1. Όταν μία πρωτεΐνη ή μέρος δραστικής ανοσοσφαιρικής πρωτεΐνης διαπερνά τις επιφάνειες των βλεννογόνων, και επεξεργάζεται από τα μακροφάγα και συναντά τα T και B λεμφοκύτταρα, μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή των IgE αντισωμάτων ειδικών

πρωτεϊνών. Αυτά τα αντισώματα έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων και των βασεόφιλων μετέπειτα αλληλεπίδραση και έκθεση στο αλλεργιογόνο μπορεί να διασυνδέσει δύο ή περισσότερα αντισώματα IgE, οδηγώντας στην απελευθέρωση νέων διαμεσολαβητών. Αυτοί οι διαμεσολαβητές είναι ισχυρά, φαρμακολογικά δραστικά μόρια τα οποία δημιουργούν σημαντικές αλλαγές στην μετατόπιση και μετακίνηση των κυττάρων, στη διαστολή των αγγείων του αίματος όπως και σε ήπια μυϊκή συστολή. Όλα αυτά τα γεγονότα οδηγούν στα συμπτώματα που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια μίας αλλεργικής αντίδρασης (Sampson & Metcalfe, 1991. Lehrer et al., 1999).

4.2 ΑΛΛΕΡΓΙΑ ΣΤΑ ΨΑΡΙΑ

Παρά την αυξανόμενη δημοτικότητα των ψαριών, η κατανάλωση τους είναι μια ανησυχία για άτομα αλλεργικά στα ψάρια. Τα ιχθυηρά θεωρείται ότι είναι από τα πιο συχνά αλλεργιογόνα τρόφιμα σε παγκόσμιο επίπεδο (Codex Alimentarius Commission, 1999. Bousquet et al., 1998). Είναι ικανά να επάγουν τις IgE αντιδράσεις υπερευαισθησίας μέσω της κατάποσης, της άμεσης επαφής και κατά την εισπνοή των οσμών των ψαριών και των καπνών που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος (Göransson, 1981. Halkier-Sørensen & Thestrup-Pedersen, 1988, 1989. Crespo et al., 1995b. Domínguez et al., 1996. Rodríguez et al., 1997). Η κατάποση του εμπλεκόμενου αλλεργιογόνου του ιχθυηρού μπορεί να προκαλέσει μια ταχεία έναρξη των συμπτωμάτων σε ασθενείς με αλλεργία στα ψάρια. Ο Untersmayr και οι συνεργάτες του (2007) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη του μπακαλιάρου απορροφάται εύκολα προγαστρικά και διανέμεται στην κυκλοφορία του αίματος των μη-αλλεργικών στα ψάρια ατόμων μέσα σε 10 λεπτά μετά την κατάποση του μαγειρεμένου μπακαλιάρου. Οι πρωτεΐνες του μπακαλιάρου αυξήθηκαν στα υψηλότερα επίπεδα στον ορό μετά από 1-2 ώρες, υποδεικνύοντας ότι το αλλεργιογόνο του μπακαλιάρου έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση, ακόμη και μετά τη γαστρική διέλευση. Τα συμπτώματα συνήθως είναι δερματικά, αναπνευστικά, και γαστρεντερικά.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, απειλητική για τη ζωή και θανατηφόρα αναφυλαξία λόγω της κατάποσης του ψαριού μπορεί επίσης να προκύψει. Ο Younginger και οι συνεργάτες του (1988) ανέφεραν έναν ενήλικα, ο οποίος πέθανε από μια αναφυλακτική αντίδραση σε ψάρι λόγω της κατάποσης τηγανητών πατατών που παρασκευάστηκαν σε λάδι που είχε

μολυνθεί με ψάρια. Από τις 32 ανθρώπινες απώλειες που καταγράφηκαν μεταξύ 1994 και 1999, και σχετίστηκαν με τροφικές αλλεργίες, περιγράφηκε μία περίπτωση θανατηφόρας αναφυλακτικής αντίδρασης στα ψάρια (Bock et al., 2001). Οι Pumphrey και Gowland (2007) ανέφεραν ότι μία από τις 48 θανατηφόρες αλλεργικές αντιδράσεις οφειλόταν σε ψάρια στο Ηνωμένο Βασίλειο μεταξύ 1999 και 2006. Σε αντίθεση με την αλλεργία στο αγελαδινό γάλα και στο αυγό που έχει κοινώς ξεπεραστεί, οι αλλεργίες στα ψάρια συχνά επιμένουν καθ' όλη την διάρκεια ζωής εάν μία φορά υπάρξει ευαισθησία, αν και οι μελέτες που έγιναν από τον Kajosaari (1982) και τον Solensky (2003) ανέφεραν ότι τα παιδιά και οι ενήλικες μπορούν μερικές φορές να αναπτύξουν ανοχή στα ψάρια.

4.3 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ

Διάφορες μελέτες έχουν προσπαθήσει να προσδιορίσουν την συχνότητα της αλλεργίας στα ψάρια. Μια τηλεφωνική έρευνα που διεξήχθη στις Ηνωμένες Πολιτείες έδειξε ότι το 0,4% του γενικού πληθυσμού είχε αλλεργία στο ψάρι με το ποσοστό συχνότητας να είναι υψηλότερο στους ενήλικες σε σύγκριση με τα παιδιά (Sicherer et al., 2004). Η συχνότητα της αλλεργίας στα ψάρια εκτιμήθηκε να είναι 0,1% στους Νορβηγικούς πληθυσμούς (Aas, 1987). Ο Björnsson και οι συνεργάτες του (1996) ανέφεραν ότι 4 (0,3%) από 1397 ενήλικες Σουηδοί είχαν ειδική IgE για τα ψάρια. Σε μια μελέτη που αφορούσε παιδιά ηλικίας 18μηνών, η επικράτηση της αλλεργίας στο ψάρι που επιβεβαιώθηκε από την SPT ή την DBPCFC ήταν 2 (0,6%) από τα 324 στην Ισλανδία και 1 (0,3%) από τα 328 στη Σουηδία (Kristjansson et al., 1999).

Αρκετές μελέτες σχετικά με τη συχνότητα της αλλεργίας στα ψάρια έχουν διεξαχθεί και στη Γαλλία. Ο André και οι συνεργάτες του (1994) ανέφεραν ότι το 24% της ευαισθητοποίησης της IgE και το 13% των αναφυλακτικών αντιδράσεων αποδόθηκαν στα ψάρια σε μια ομάδα 580 ασθενών με ανεπιθύμητες αντιδράσεις σε τρόφιμα. Σε μια άλλη γαλλική μελέτη μαθητών ηλικίας 9-11 ετών, η συχνότητα της αυτοαναφερόμενης αλλεργίας στα ψάρια που επιβεβαιώνεται από SRT είχε εκτιμηθεί σε 0,7% μεταξύ 6672 συμμετεχόντων στην έρευνα (Pénard-Morand et al., 2005). Ο Rancé και οι συνεργάτες του (2005), υπολόγισαν ότι το 7,8% (19/244) των τροφίμων που έχει αναφερθεί ότι προκαλούν τροφικές αλλεργίες αποδόθηκαν στα ψάρια, σε 183 παιδιά με αυτοαναφερόμενες τροφικές αλλεργίες στη Γαλλία. Στην Ισπανία, τα ψάρια έχουν ταυτοποιηθεί ως η δεύτερη πιο συχνά εμπλεκόμενη τροφή που προκαλεί αντιδράσεις υπερευαισθησίας στα παιδιά μετά τα αυγά,

με ένα ποσοστό συχνότητας 17,8% (Crespo et al., 1995a). Μια έρευνα που αφορούσε 15 χώρες και 17280 ενήλικες έδειξε ότι το 2,2% των ατόμων είχαν αλλεργία στα ψάρια ή δυσανεξία στα ψάρια (Woods et al., 2001).

Ο Iikura (1998) έδειξε ότι η συχνότητα των ιχθυηρών ως υπεύθυνων για την πρόκληση αλλεργιών ήταν κάπως υψηλότερη στην Ιαπωνία, σε σύγκριση με τις δυτικές χώρες. Η συχνότητα εμφάνισης της αλλεργίας στα ιχθυηρά τεκμηριώνεται σε μια πανεθνική έρευνα στην Ιαπωνία η οποία έδειξε ότι 110 (4,5%) από 2434 ασθενείς ήταν αλλεργικοί στα ψάρια (Iikura & Imai, 2001. Aihara et al., 2003). Μια πρόσφατη πανεθνική έρευνα ερωτηματολογίου που διεξήχθη στην Ιαπωνία ανέφερε ότι το πελαγίσιο λυθρίνι και ο τόνος ήταν υπεύθυνα για την πρόκληση αναφυλαξίας σε 6 (1,9%) και σε 5 (1,6%) από τους 319 ασθενείς με αυτοαναφερόμενη αναφυλαξία (Imamura et al., 2008). Η αλλεργία στα ιχθυηρά είναι κοινή μεταξύ των κοινοτήτων που τρέφονται με ιχθυηρά και αυτών που τα επεξεργάζονται (Aas, 1987). Διατυπώθηκε η άποψη ότι η επικράτηση της αλλεργίας στα ιχθυηρά συσχετίστηκε με το ποσό της πρόσληψης ψαριών. Για παράδειγμα, ο Crespo και οι συνεργάτες του (1995a) αναφέρουν ότι η αλλεργία στο ψάρι είναι πιο συχνή στις Σκανδιναβικές χώρες όπου η κατανάλωση ψαριών είναι υψηλή. Ωστόσο, μια συγκριτική μελέτη έδειξε ότι παρά την κατανάλωση των ψαριών που ήταν τρεις φορές υψηλότερη στο Ρέικιαβικ (Ισλανδία) σε σύγκριση με την Ουψάλα (Σουηδία), η επικράτηση της ευαισθητοποίησης της IgE για τα ψάρια (0,2%) δεν ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των δύο εθνικά παρόμοιων πληθυσμών (Gislason et al., 1999).

4.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της αλλεργίας σε ιχθυηρά περιλαμβάνει κλινικό ιστορικό του ασθενούς, SPT ή και δοκιμές ορού ειδικών IgE των ψαριών, και από του στόματος προσομοίωση τροφίμων. Η SPT είναι μια γρήγορη και σχετικά ασφαλής μέθοδος για τον εντοπισμό των ασθενών με κλινικά ιστορικά που υποδηλώνουν μία IgE-μεσολαβούμενη αντίδραση. Τα αποτελέσματα της δοκιμής του δέρματος θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή λόγω των υψηλών ψευδών θετικών απαντήσεων από αλλεργιογόνα διασταυρούμενης αντίδρασης (Wild & Lehrer, 2005). Εναλλακτικά, οι μετρήσεις των δοκιμών ορού ειδικών IgE των ψαριών είτε με RAST ή βελτιωμένες μεθόδους, όπως η Pharmacia CAP-RAST FEIA χρησιμοποιούνται συνήθως για τη διάγνωση (Wild & Lehrer, 2005). Τόσο η SPT όσο και η RAST έχουν

εξαιρετική ευαισθησία και αρνητική προγνωστική ακρίβεια, αλλά κακή ειδικότητα και θετική προγνωστική ακρίβεια.

Η απουσία αλλεργιών στα ψάρια μπορεί ουσιαστικά να επιβεβαιωθεί με αρνητικές SPT και RAST αντιδράσεις λόγω της υψηλής αρνητικής προγνωστικής ακρίβειας, ενώ μια θετική απάντηση δεν αποδεικνύει κατ' ανάγκη κλινική αλλεργία στα ψάρια. Παρ' όλα αυτά, η παρουσία της κλινικής αλλεργίας μπορεί να επιβεβαιωθεί με ένα συνδυασμό των θετικών απαντήσεων SPT και ένα πρόσφατο σαφές ιστορικό των αλλεργικών αντιδράσεων που προκαλούνται από τρόφιμα (Sicherer & Sampson, 2010). Οι Sampson και Deborah (1997) αξιολόγησαν τη χρησιμότητα των ποσοτικών τιμών IgE ειδικού-αλλεργιογόνου στη διάγνωση της IgE-μεσολαβούμενης αλλεργίας σε τρόφιμα. Σύμφωνα με την αναδρομική μελέτη, το επίπεδο ορού αντισωμάτων IgE από 20 kU_A / L και πάνω στο ψάρι, ήταν προβλέψιμο στα ψάρια που προκαλούν κλινικά συμπτώματα, με μεγαλύτερη από 95% βεβαιότητα. Μια επακόλουθη προορατική μελέτη επιβεβαίωσε την αποτελεσματικότητα των συγκεντρώσεων των ειδικών IgE από ψάρια για την πρόβλεψη της κλινικής δραστηριότητας (Sampson, 2001).

Μία δοκιμή προσομοίωσης τροφίμου απαιτείται, εάν η SRT ή οι ορολογικές εξετάσεις δεν παρέχουν μια σαφή ένδειξη της ανοχής σε συγκεκριμένα είδη ψαριών ή η πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ ειδών ψαριών δεν είναι καλά χαρακτηριζόμενη. Σύμφωνα με μια περίπτωση μελέτης που αναφέρθηκε από τον Pascual και τους συνεργάτες του (2008), ένα αγόρι 2 χρονών που είχε διαγνωστεί με IgE-μεσολαβούμενη αλλεργία στα ψάρια είχε ειδική-IgE ξιφία σε $\leq 0,35$ kU/L και ειδική-IgE $\geq 0,9$ kU l σε άλλα είδη ψαριών. Λόγω της παρουσίας των ειδικών IgE έναντι όλων των ειδών ψαριών που δοκιμάστηκαν, πλην του ξιφία, η ανοχή στο ν ξιφία δεν είναι γνωστή. Στη συνέχεια, μία δοκιμή προσομοίωσης από του στόματος εκτελέστηκε και έδειξε θετική αντίδραση σε ξιφία. Ως εκ τούτου, συστήθηκε μια διατροφή απαλλαγμένη από όλα τα είδη ψαριών. Σε σύγκριση με άλλα είδη ψαριών που μελετήθηκαν, τα ψάρια από τις οικογένειες των Tunidae (π.χ. τόνος) και των Xiphiidae (π.χ. ξιφίας) φαίνεται να είναι τα λιγότερο αλλεργιογόνα. Ασθενείς οι οποίοι αντιδρούν σε αυτά τα είδη στη δοκιμή τροφικής προσομοίωσης είναι πολύ απίθανο να έχουν ανοχή σε οποιαδήποτε άλλα είδη ψαριών, και έτσι μια πλήρη δίαιτα με αποκλεισμό των ψαριών είναι απαραίτητη (Pascual et al., 2008).

Η διάγνωση της αλλεργίας των ψαριών μπορεί να εμφανίζει δυσκολίες λόγω των διακυμάνσεων που διαπιστώνονται μεταξύ ατόμων, σχετικά με την εξειδίκευση της αλλεργίας στα ψάρια, συμπεριλαμβανομένης της αλλεργίας σε ψάρια όλων των ειδών, της αλλεργίας στα ψάρια με μερική ανοχή σε συγκεκριμένα είδη, και της μονο-ειδικής αλλεργίας στα ψάρια (Pascual et al., 2008). Τα άτομα που αντιδρούν στην παρβαλβουμίνη χρειάζεται πιθανότατα να αποφεύγουν όλα τα είδη ψαριών, ενώ τα άτομα που αντιδρούν σε αλλεργιογόνα που είναι ειδικά για το είδος (species-specific) φαίνεται να είναι ανεκτικά σε ορισμένα είδη ψαριών (Taylor et al., 2004). Τα κλινικά ποσοστά διασταυρούμενης δραστηριότητας μεταξύ ενός ψαριού και των άλλων είναι περίπου 50 %, αλλά οι ατομικές διαφορές όντως υπάρχουν (Sicherer and Sampson, 2010). Γενικώς, τα άτομα που είναι αλλεργικά στα ψάρια συμβουλεύονται να αποκλείουν όλα τα είδη ψαριών από τη διατροφή τους, εκτός εάν διαγνωστεί ότι είναι κλινικά ανεκτικά σε συγκεκριμένα είδη ψαριών, με την μελέτη προσομοίωσης τροφίμου από του στόματος (Helbling et al., 1999). Οι διαγνωστικές διαδικασίες θα πρέπει να διεξάγονται με προσοχή για να αποφευχθεί η σύγχυση με άλλες ανεπιθύμητες αντιδράσεις στα ψάρια, όπως η IgE-μεσολαβούμενη αντίδραση σε νηματοσκώληκες *Anisakis simplex* και η δηλητηρίαση από ισταμίνη και άλλες βιογενείς αμίνες (scombroid fish poisoning).

4.5 ΚΑΤΩΤΑΤΟ ΟΡΙΟ

Τα ψάρια είναι γνωστό ότι επάγουν σοβαρές IgE-μεσολαβούμενες αλλεργικές αντιδράσεις σε χαμηλές δόσεις έκθεσης. Η ελάχιστη δόση που μπορεί να τις προκαλέσει στην περίπτωση των ιχθυηρών αξιολογήθηκαν με μια δοκιμή DBPCFC σε 14 ασθενείς αλλεργικούς στα ψάρια και εκτιμήθηκε σε 5mg μπακαλιάρου ή ρέγκας (Taylor et al., 2002). Ωστόσο, το κατώτερο όριο δόσης για τα ψάρια παραμένει αδιευκρίνιστο, δεδομένου ότι προσομοιώσεις χαμηλής δόσης έχουν διεξαχθεί μόνο για ένα μικρό αριθμό ασθενών και με λίγα μόνο είδη ψαριών (Taylor et al., 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι η μειωμένη γαστρική πέψη θα μπορούσε να επηρεάζει τα επίπεδα του κατώτατου ορίου του αλλεργιογόνου του μπακαλιάρου σε ευαίσθητοποιημένα άτομα (Untersmayr et al., 2005, 2007). Σύμφωνα με την DBPCFC, οι πρωτεΐνες του μπακαλιάρου που υποβλήθηκαν σε πέψη κάτω από υπόξινες συνθήκες σε pH 3,0, φάνηκε να μειώνουν το ανεκτό κατώτερο όριο δόσης των πρωτεϊνών του

μπακαλιάρου κατά 10 έως 30 φορές σε σύγκριση με την πέψη σε pH 2,0 (Untersmayr et al., 2007).

4.6 ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Δύο οπότες A και B έχουν κοινό ή έναν ή περισσότερους επιτόπους και τα στο χείμα της ανοσοποιητικής απάντησης που διεγείρονται έναντι επιτόπου της ουσίας A αναγνωρίζουν έναν, ή περισσότερους, επιτόπους που βρίσκονται στην ουσία B. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **διασταυρούμενη αντίδραση (crossreactivity)** ή «φαινόμενο πληθυσμού» (**population phenomenon**),

- Διασταυρούμενη αντίδραση παρατηρείται επίσης, όταν αντισώματα ή λεμφοκύτταρα, με ειδικότητα για έναν επίτοπο, συνδέονται, συνήθως ασθενώς, με άλλον επίτοπο που δεν μοιάζει πολύ με τον πρώτο επίτοπο. Έτσι, στη περίπτωση που η χρησιμοποιούμενη για την ανοσοποίηση ουσία διαφέρει από εκείνη με την οποία αντιδρούν τα προϊόντα της ανοσιακής απάντησης, η ουσία αυτή ονομάζεται **ετερόλογη (heterologous)**. Αντίθετα, όταν η χρησιμοποιούμενη για την ανοσοποίηση ουσία είναι όμοια με εκείνη που αντιδρούν τα προϊόντα της ανοσιακής απάντησης, τότε, η ουσία αυτή ονομάζεται **ομόλογη (homologous)**.
- Διασταυρούμενη αντίδραση παρατηρείται επίσης όταν δύο διαφορετικά αντιγόνα μπορούν να έχουν ένα ή περισσότερους επιτόπους που έχουν όμοια τρισδιάστατα χαρακτηριστικά. Αυτά τα αντιγόνα ονομάζονται **ετερόφιλα (heterophile)**.

Η διασταυρούμενη αντίδραση έχει αναφερθεί μεταξύ διαφορετικών ειδών ψαριών. Σε μια ομάδα 20 παιδιών που ήταν αλλεργικά στον μπακαλιάρο, ο DeMartino και οι συνεργάτες του (1990) βρήκαν ότι όλα έδειξαν θετικές τις δοκιμές δέρματος σε 1 ή περισσότερα από 17 είδη ψαριών. Παρ' όλα αυτά, τα παιδιά δεν ήταν ομοιόμορφα ευαίσθητα σε όλα τα είδη των ψαριών που εξετάστηκαν. Στην πραγματικότητα, η συχνότητα θετικών δερματικών δοκιμών που προσδιορίστηκε στο χέλι, το λαβράκι, τη συναγρίδα, τη γλώσσα, και τον τόνο ήταν υψηλότερη. Σε μια μελέτη που διεξήχθη από τον Hansen και τους συνεργάτες του (1997), και οι 8 κλινικώς αλλεργικοί σε μπακαλιάρο ενήλικες έδειξαν σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση στο βακαλάο, στο σκουμπρί, στη χωματίδα και στη ρέγκα, όπως εκτιμήθηκε από πολλές δοκιμές, συμπεριλαμβανομένης της SPT, της δοκιμής

απελευθέρωσης ισταμίνης, της RAST, και της ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE με ανοσοαποτύπωση.

Ο Sten και οι συνεργάτες του (2004) εξέτασαν αν οι ασθενείς που ήταν αλλεργικοί στον μπακαλιάρo παρουσίασαν διασταυρούμενη αντίδραση σε ψάρια όπως το προβατόψαρο, το φουσκοχειλόχελο και το χέλι (roul, eelroul, eel) που καταναλώνονται σπάνια στη Σκανδιναβική διατροφή. Όλοι εκ των 18 ασθενών είχαν ειδική IgE και στα τέσσερα είδη ψαριών και 17/18 ασθενείς αντέδρασαν σε όλα τα είδη ψαριών στην SPT. Μια πρόσφατη μελέτη διασταυρούμενης αντίδρασης στη Νορβηγία απέδειξε ότι 9/10 αλλεργικών στα ψάρια ασθενών είχαν θετική SPT για τις φυσικές παρβαλβουμίνες από μπακαλιάρo, σολομό και μαύρο μπακαλιάρo. Από τους 7 ασθενείς που ελέγχθηκαν δερματικά με ρέγκα, λυκόψαρο, τόνο και σκουμπρί, όλοι αντέδρασαν έντονα στη ρέγκα και στο λυκόψαρο, ενώ 6/7 ασθενείς αντέδρασαν ασθενώς ή ήταν αδιάφοροι στον τόνο και το σκουμπρί. Τα αποτελέσματα της SPT υποστηρίχθηκαν από τις δοκιμασίες *in vitro* ειδικών IgE αντισωμάτων ψαριών (VanDo et al., 2005a).

Παρά την εκτεταμένη ορολογική διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ διαφορετικών ειδών ψαριών, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς αλλεργικοί σε ψάρια είναι σε θέση να καταναλώνουν ένα ή περισσότερα είδη ψαριών, χωρίς να αντιμετωπίζουν τυχόν ανεπιθύμητες ενέργειες. Μια πρόωμη μελέτη από τον Aas (1966) έδειξε ότι μεταξύ 61 παιδιών, αλλεργικών σε μπακαλιάρo, 34 από αυτά αντέδρασαν σε όλα τα ψάρια, αλλά 27 παιδιά ήταν ανεκτικά σε ένα ή περισσότερα είδη ψαριών. Εκτός αυτού, τα εκχυλίσματα σολομού προκάλεσαν θετική δερματική δοκιμή σε παιδιά που θα μπορούσαν να καταναλώσουν με ασφάλεια σολομό. Εξάλλου, μια προορητική μελέτη από τους Bernhisel-Broadbent και συνεργάτες (1992a), αποκάλυψε ότι 26 ασθενείς με θετική SPT σε συγκεκριμένα είδη ψαριών θα μπορούσαν να είναι ανεκτικοί στην κατάποση αυτών των ψαριών, όπως κρίθηκε από την προσομοίωση λήψης από του στόματος. Μέσω της χρήσης της ανοσοαποτύπωσης και της ανάλυσης ELISA, ειδική-IgE του ορού έδειξε αντιδραστικότητα στα ψάρια που οι ασθενείς ήταν σε θέση να ανεχθούν κλινικά, όπως επιβεβαιώθηκε με την προσομοίωση λήψης από του στόματος. Οι μελέτες αυτές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι ορολογικές και *in vitro* διαγνωστικές εξετάσεις διασταυρούμενης αντιδράσεως μεταξύ των διαφόρων ειδών ψαριών δεν σχετίζονται απαραίτητα με την κλινική διασταυρούμενη αντίδραση. Ωστόσο, ο Helbling και οι

συνεργάτες του (1999) ανέφεραν υψηλή συσχέτιση μεταξύ SPT και των αντιδράσεων της από του στόματος προσομοίωσης. Σε αυτή τη μελέτη, η διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των διαφόρων ειδών ιχθυηρών από ταξινομικά διακριτές τάξεις φάνηκε να είναι κλινικά σημαντική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΛΛΕΡΓΙΟΝΑ ΙΧΘΥΗΡΩΝ

5.1 ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡ-ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ EF-HAND

Το μοτίβο περιλαμβάνει δύο α-έλικες, τις E και F, που βρίσκονται εκατέρωθεν ενός βρόχου 12 συνεχόμενων καταλοίπων. Πέντε από τα κατάλοιπα του βρόχου συμμετέχουν στην πρόσδεση του ασβεστίου και συνεπώς οι πλευρικές τους ομάδες πρέπει να περιέχουν ένα άτομο οξυγόνου.

Οι EF-hand πρωτεΐνες υποδιαιρούνται σε 32 υποοικογένειες, ενώ 42 αλλεργιογόνα βρέθηκαν σε μερικές από αυτές. Δύο μεγάλες οικογένειες αλλεργιογόνων διασταυρούμενης αντίδρασης έχουν σημασία, τα αλλεργιογόνα από τη γύρη και τα αλλεργιογόνα παρβαλβουμίνες από τα ψάρια. Εκεί ανήκει επίσης ένα αυτό-αλλεργιογόνο, το Homs 4, που αναγνωρίζεται σε ασθενείς που πάσχουν από ατοπική δερματίτιδα. Η IgE ικανότητα δέσμευσης του EF-hand τομέα που περιέχουν τα αλλεργιογόνα δείχθηκε να είναι εξαρτώμενη από το ασβέστιο.

5.2 ΠΑΡΒΑΛΒΟΥΜΙΝΗ

Η παρβαλβουμίνη (Gad c 1) ήταν το πρώτο βασικό αλλεργιογόνο του γάδου (*Gadus callarias*) που εντοπίστηκε και απομονώθηκε (Elsayed & Aas, 1971a). Μεταγενέστερες μελέτες έχουν απομονώσει τα ομόλογα αλλεργιογόνα από το σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*), το Ιαπωνικό σαφρίδι (*Trachurus japonicus*), το Ιαπωνικό χέλι (*Anguilla japonica*), το μεγαλόφθαλμο τόνο (*Thunnus obesus*), τον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*), το γάδο του Ατλαντικού (*Gadus morhua*), τον κολιό και το σκουμπρί (*S. japonicus*, *S. australasicus*, *S. scombrus*), και τον γάδο της Αλάσκας (*Theragra chalcogramma*) (Lindstrøm et al., 1996. Shiomi et al., 1998, 1999. Van Do et al., 1999, 2003, 2005b. Swoboda et al., 2002. Hamada et al., 2003a, 2004). Αυτά τα αλλεργιογόνα απομονώθηκαν είτε με συνδυασμούς διήθησης πήγματος, ανταλλαγής ανιόντων και υψηλής απόδοσης τεχνικές υγρής χρωματογραφίας, ή απομονώθηκαν με την μέθοδο κλωνοποίησης cDNA. Οι παρβαλβουμίνες που απομονώθηκαν στις εν λόγω μελέτες ήταν, όπως επιβεβαιώθηκε,

αυτές που αντιπροσωπεύουν τις κύριες πηγές αλλεργιογόνων στα ψάρια, λόγω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν ειδικά –IgE αντισώματα από άτομα αλλεργικά στα ψάρια.

Η παρβαλβουμίνη έχει αναγνωριστεί ως ένα παν-αλλεργιογόνο που βρίσκεται παρόν στα περισσότερα είδη ψαριών και στο βάτραχο, και είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη διασταυρούμενη αντίδραση. Αυτό το αλλεργιογόνο είναι ικανό να ευαισθητοποιήσει αλλεργικούς ασθενείς σε πολλαπλά είδη ψαριών, και σε ορισμένες περιπτώσεις προκαλεί θετικές δερματικές δοκιμασίες σε ορισμένα είδη ψαριών που οι ασθενείς δεν έχουν καταναλώσει ποτέ. Οι παρβαλβουμίνες είναι μικρού μοριακού βάρους (10-13 kDa), όξινες και υδατο-διαλυτές σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες. Ωστόσο, έχει αναφερθεί η ικανότητα της παρβαλβουμίνης του γάδου να σχηματίζει διμερή (24 kDa) που εξακολουθούν να έχουν ικανότητα δέσμευσης των IgE αντισωμάτων (Das Dore et al., 2002).

Οι παρβαλβουμίνες ταξινομούνται στην υπεροικογένεια EP-hand, μια ομάδα πρωτεϊνών με εξαιρετικά σταθερό δομικό μοτίβο (έλικα-βρόγχος-έλικα) που συνδέει δισθενή κατιόντα, π.χ. ασβέστιο και μαγνήσιο, με διαφορετική συγγένεια (Nakayama & Kretsinger, 1994). Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή της παρβαλβουμίνης του κυπρίνου που αναλύθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, η πρωτεΐνη αποτελείται από τρεις τομείς, ονομαστικά AB, CD και EF (Kretsinger & Nockolds, 1973). Κάθε τομέας αποτελείται από έναν κεντρικό βρόγχο που πλαισιώνεται από δύο αμφιφιλικές (διαθέτουν ταυτόχρονα υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές) άλφα-έλικες με 12 παρακείμενα κατάλοιπα αμινοξέων, από τα οποία προέρχεται το οξυγόνο που δημιουργεί συνδέσμους με το ασβέστιο (Strynadka & James, 1989. Permyakov et al., 2008). Οι CD και EF περιοχές έχουν τις ιδιότητες δέσμευσης ασβεστίου, ενώ ο τομέας AB στερείται την ικανότητα να δεσμεύει ασβέστιο, παρά το γεγονός ότι έχει δομή παρόμοια με τις περιοχές CD και EF (Kretsinger & Nockolds, 1973). Οι ακριβείς λειτουργίες των παρβαλβουμινών παραμένουν ασαφής. Εντούτοις, είναι γενική η παραδοχή ότι στους μυς οι παρβαλβουμίνες ενεργούν ως ρυθμιστές του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα και συμβάλλουν στη χαλάρωση των μυών, μετά τη σύσπαση, συνδέοντας το ενδοκυτταρικό ασβέστιο (Erickson & Moerland, 2006).

Τουλάχιστον δύο συγγενικές σειρές παρβαλβουμίνης πιστεύεται ότι υπήρξαν στους προγόνους των σπονδυλωτών, οι άλφα και βήτα. Στα πτηνά και στον άνθρωπο εκφράζεται μόνο η μορφή άλφα, αν και η ογκομοδουλίνη του ανθρώπου είχε χαρακτηριστεί ως βήτα

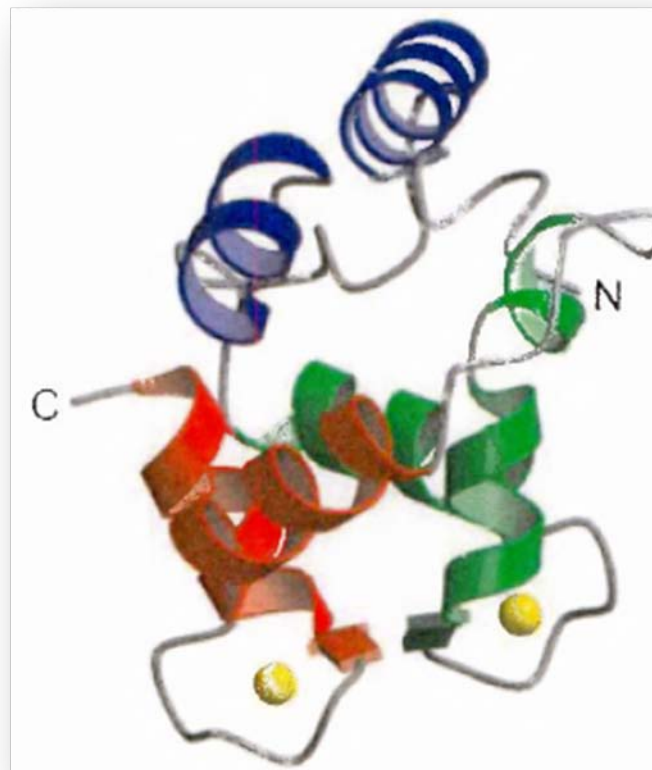
παρβαλβουμίνη. Έχει υποστηριχθεί ότι στα θηλαστικά η βήτα μορφή μπορεί να είναι μια άλλη ισομορφή, και το γονίδιο που κωδικοποιεί τη βήτα-παρβαλβουμίνη μπορεί να έχει διαγραφεί ή αδρανοποιηθεί. Η ογκομοδουλίνη είναι μια πρωτεΐνη όγκου, η οποία εκφράζεται και στον εμβρυϊκό πλακούντα, καθώς και στον μυϊκό ιστό, μετά τη γέννηση των θηλαστικών. Στον άνθρωπο, η άλφα παρβαλβουμίνη φαίνεται να προστατεύει τους νευρώνες από το θάνατο των κυττάρων που προ κλείεται με τη μεσο βήση το υ ασβεστίου.

Οι παρβαλβουμίνες άλφα είναι άφθονες στα ψάρια και τα αμφίβια και δεν είναι γενικά αλλεργιογόνα. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν δύο αναφορές σχετικά με μια αλλεργιογόνο άλφα παρβαλβουμίνη σε βάτραχο. Αντίθετα, αλλεργιογόνες βήτα παρβαλβουμίνες είναι γνωστές σε πολλά είδη ψαριών. Οι παρβαλβουμίνες ψαριών της βήτα γενιάς είναι μόνο 56% ταυτόσημες με την ανθρώπινη άλφα ισομορφή. Αν και τα δύο μοτίβα δέσμευσης του ασβεστίου είναι άκρως προστατευμένα σε όλες τις παρβαλβουμίνες, δεν έχει παρατηρηθεί IgE διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των άλφα και βήτα παρβαλβουμίνων από τους περισσότερους μυς των σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Η απουσία του αλλεργιογόνου δυναμικού της άλφα παρβαλβουμίνης στα ψάρια και τους ανθρώπους θα μπορούσε να ερμηνευτεί από τη διαγραφή της θέσης δέσμευσης IgE στο μοτίβο σύνδεσης του ασβεστίου κατά τη διάρκεια της εξέλιξης.

Η βήτα-παρβαλβουμίνη περιγράφεται ως το μείζον αλλεργιογόνο σε πολλά είδη ψαριών και προκαλεί ήπια έως σοβαρά συμπτώματα σε ασθενείς αλλεργικούς στα ψάρια, κυρίως στις παράκτιες χώρες. Η μορφή που συνδέεται με το ασβέστιο έχει αποδειχθεί ανθεκτική στη θερμική κατεργασία και τα πεπτικά ένζυμα. Η απώλεια ασβεστίου προκαλεί δομικές αλλαγές και σημαντική μείωση της σύνδεσης IgE. Ανάλογα με το είδος του ψαριού, η επεξεργασία του τροφίμου μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα δέσμευσης IgE, όπως έχει αναφερθεί για τις κονσέρβες τόνου και σολομού. Η IgE αντιδραστικότητα μπορεί επίσης να ενισχυθεί με τον σχηματισμό υψηλού μοριακού συσσωματώματος κατά το μαγείρεμα, όπως έχει δείχθει για τον τόνο, το σολομό, τον μπακαλιάρο και το καλκάνι.

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, οι παρβαλβουμίνες διαίρουνται σε δύο διακριτές φυλογενετικές καταγωγές, α και β. Η άλφα παρβαλβουμίνη έχει pI μεγαλύτερο από 5 και περιέχει ένα επιπλέον κατάλοιπο αμινοξέος στην C-τερματική έλικα, ενώ η βήτα

παρβαλβουμίνη έχει pI μικρότερο από 4,5 (Goodman & Peckère, 1977). Επιπλέον, τόσο η άλφα όσο και η βήτα μορφή των παρβαλβουμινών διαφέρουν το λιγότερο σε 11 κατάλοιπα. Η κυστεΐνη στη θέση 18 και το ασπαρτικό οξύ στη θέση 61 απαντούν τυπικά στις β-παρβαλβουμίνες (Permyakov, 2006). Όλα τα σπονδυλωτά, μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος, εκφράζουν την παρβαλβουμίνη σε διάφορα επίπεδα στους σκελετικούς μυς. Τα κατώτερα σπονδυλωτά, όπως τα ψάρια, περιέχουν υψηλότερες ποσότητες παρβαλβουμίνης στους μυς, σε σχέση με τα ανώτερα σπονδυλωτά (Permyakov, 2006).



Εικόνα 2: Τρισδιάστατη δομή παρβαλβουμίνης κυπρίνου, σε μορφή «κορδέλας». Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι α-έλικες που σχηματίζουν τις μη-λειτουργικές N-άκρες. Τα δυο λειτουργικά EF-hand μοτίβα απαρτίζονται από α-έλικες και β-έλικες που εμφανίζονται με κόκκινο και πράσινο χρώμα. Ο φαρδύς βρόγχος απεικονίζει β-έλικες και τα συνδεδεμένα ιόντα ασβεστίου φαίνονται ως κίτρινες σφαίρες.

Η συγκέντρωση των παρβαλβουμινών στους σκελετικούς μυς των ψαριών ποικίλλει επίσης με τον τύπο του μυός. Δύο ιστοχημικοί τύποι μυϊκών ινών, ο λευκός και ο ερυθρός, είναι υπεύθυνοι για τα διαφορετικά κινητήρια συστήματα στα ψάρια. Οι λευκοί μύες

χρησιμοποιούνται κυρίως για έντονες συσπάσεις βραχείας διάρκειας, όπως οι κινήσεις που σχετίζονται με τη σύλληψη της τροφής ή την απόδραση από τους θηρευτές, ενώ οι ερυθροί μύες χρησιμεύουν κυρίως για την βραδύτερη αλλά παρατεταμένη κίνηση (Willmer et al., 2009). Οι λευκοί μύες υφίστανται κόπωση πιο γρήγορα από τους ερυθρούς, οι οποίοι διαθέτουν πυκνότερο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων και πλούσια παροχή οξυγόνου. Σε αντίθεση με τους λευκούς μυς που στηρίζονται στην αναερόβια γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας, λόγω έλλειψης μυοσφαιρίνης και περιορισμένης παρουσίας μιτοχονδρίων, οι ερυθροί μύες διαθέτουν άφθονη μυοσφαιρίνη και μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα η ενέργεια σε αυτούς να παράγεται μέσω της αερόβιας οξειδωσης των λιπών (Helfman et al., 2009). Τα βενθικά ψάρια τείνουν να έχουν χαμηλότερα ποσοστά ερυθρών μυών σε σύγκριση με τα πελαγικά ψάρια που κολυμπούν διαρκών (Sen, 2005). Οι λευκοί μύες συνήθως έχουν περισσότερο σαρκοπλασμικό δίκτυο και παρβαλβουμίνη από τους ερυθρούς μυς. Οι Lim et al. (2005) ανέφεραν ότι η παρβαλβουμίνη είναι παρούσα στο λευκό μυ του τόνου (*Thunnus tonggol*), ενώ απουσιάζει από τον ερυθρό μυ. Η αλλεργιογόνος ικανότητα των λευκών και ερυθρών μυών των ψαριών σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την περιεχόμενη παρβαλβουμίνη. Οι Kobayashi et al. (2006) έδειξαν ότι οι ερυθροί μύες είναι λιγότερο αλλεργιογόνοι από τους λευκούς μυς, και αυτό οφείλεται στη χαμηλότερη περιεκτικότητα παρβαλβουμίνης των ερυθρών μυών. Επιπροσθέτως, ένα υψηλότερο επίπεδο έκφρασης της παρβαλβουμίνης παρατηρείται στα νεότερα, απ' ότι στα μεγαλύτερα ψάρια.

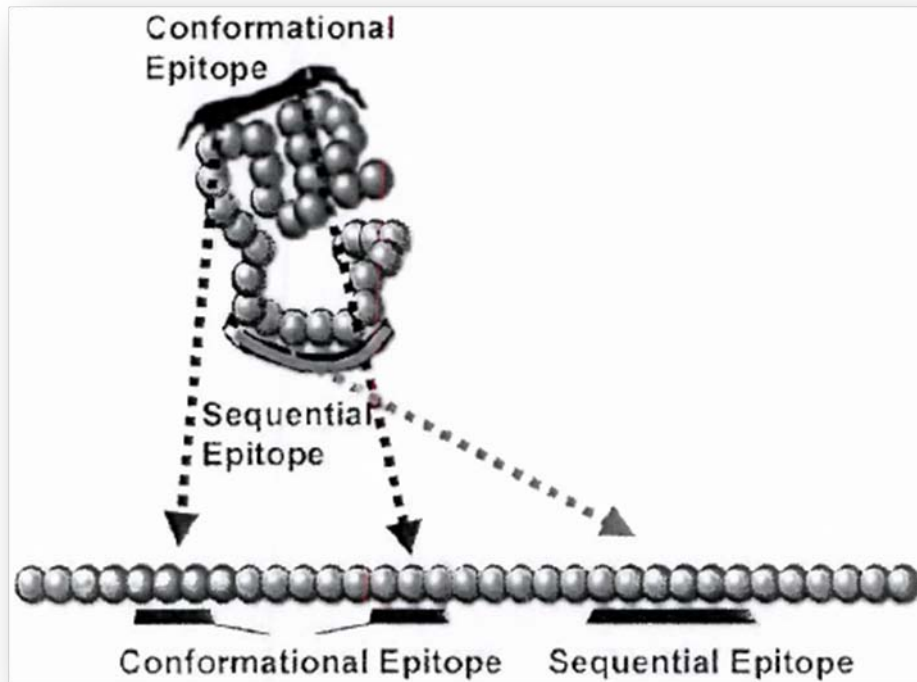
Έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα είδη ψαριών εκφράζουν από δύο έως πέντε ισότυπους παρβαλβουμίνης, οι οποίοι διαθέτουν διαφορετικές συγγένειες για το ασβέστιο και το μαγνήσιο. Δύο διακριτοί ισότυποι παρβαλβουμίνης ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση cDNA κλώνων από σολομό του Ατλαντικού, κυπρίνο, μπακαλιάρο του Ατλαντικού και της Αλάσκας (Lindstrøm et al., 1996. Swoboda et al., 2002. Van Do et al., 2003, 2005b). Το Gad c 1 είναι ένα πολύ σταθερό αλλεργιογόνο. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αλλεργιογόνος δράση του Gad c 1 δεν επηρεάζεται σημαντικά από τις ακραίες τιμές pH, τη θερμική μετουσίωση ή τη χημική τροποποίηση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αλλεργιογόνος δραστηριότητα των Gad c 1 εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την κύρια δομή, παρά από τη μοριακή διαμόρφωση (Elsayed & Aas, 1971b). Ωστόσο, η συμβολή της στερεοχημικής διαμόρφωσης στην αλλεργιογόνο δράση της παρβαλβουμίνης των ψαριών δεν είναι

αμελητέα. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η εξάντληση του ασβεστίου από τις παραλβουμίνες του κυπρίνου και του βατράχου μειώνει σημαντικά την IgE πρόσδεση σε αυτές παραλβουμίνες (Bugajska-Schretter et al., 2000. Swoboda et al., 2002. Hilger et al., 2004). Σύμφωνα με την ανάλυση κυκλικού διχρωμισμού, η απώλεια της IgE-αντιδραστικότητας συνδέεται με την αλλαγή στη διαμόρφωση της παραλβουμίνης, όταν εξαντλείται το ασβέστιο (Bugajska-Schretter et al., 2000).

Η αποσαφήνιση της σύνδεσης με IgE επίτοπα είναι απαραίτητη για την καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των αλλεργιογόνων και των IgE αντισωμάτων του ανοσοποιητικού συστήματος. Πρώιμες μελέτες των Elsayed και Apold (1983) εντόπισαν αρκετά επίτοπα δέσμευσης IgE με βάση την ανοσολογική αντιδραστικότητα πεπτιδικών θραυσμάτων που προέκυψαν από τη μερική υδρόλυση με θρυψίνη, και τα συνθετικά πεπτίδια του Gad c 1 με IgE από τον ορό ασθενών που ήταν αλλεργικοί στα ψάρια. Πέντε διαφορετικά θραύσματα που αντιστοιχούσαν στα κατάλοιπα 13-32 (τομέας AB), 33-44 (άξονας που ενώνει τους τομείς AB και CD), 49-64 (βρόγχος δέσμευσης ασβεστίου του τομέα CD), 65-74 (άξονας που ενώνει τους τομείς CD και EF), και 8 896 (βρόγχος δέσμευσης ασβεστίου του τομέα EF) της Gad c 1 θεωρήθηκε ότι περιείχαν επίτοπα σύνδεσης με IgE (Elsayed & Apold, 1983). Με χρήση υπολογιστικής αντιστοίχισης των μιμιτόπων επί της μοριακής επιφάνειας της φυσικής παραλβουμίνης του κυπρίνου εντοπίστηκαν τρεις περιοχές επίτοπων. Δύο από τα επίτοπα βρέθηκαν σε περιοχές που συνδέουν τους τομείς AB και CD και τους τομείς CD και EF, αντίστοιχα, ενώ το τρίτο επίτοπο βρέθηκε στην περιοχή συνδέσεως ασβεστίου του EF-τομέα (Untersmayr et al., 2006). Μια πρόσφατη μελέτη από τους Yoshida et al. (2008) προσδιόρισε την περιοχή 21-40 της παραλβουμίνης σε σκουμπρί του Ειρηνικού ως το κύριο επίτοπο δέσμευσης IgE, με βάση τη χαρτογράφηση των επίτοπων σε 10 επικαλυπτόμενα πεπτίδια. Η περιοχή 21-40 φάνηκε να είναι μάλλον ειδική για την παραλβουμίνη στο σκουμπρί.

Τα IgE επίτοπα πρόσδεσης κατανέμονται σε ολόκληρο το μήκος της αλυσίδας του πολυπεπτιδίου της παραλβουμίνης. Η AB πλευρά, η οποία περιέχει επίσης αντιδραστικά επίτοπα IgE, είναι πιο προστατευμένη στο βάτραχο και τα ψάρια και έτσι παρατηρείται η διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ διαφορετικών ειδών ψαριών, ακόμη και με το βάτραχο. Ωστόσο, καμία IgE διασταυρούμενη αντίδραση δεν έχει περιγραφεί για άλλα είδη, πλην των ψαριών και αμφιβίων, καθώς «η ομολογία της αλληλουχίας μειώνεται με τη μείωση της

ζωολογικής σχέσης». Η διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ ψαριών έχει κλινική σημασία, καθώς οι ασθενείς είναι συχνά αλλεργικοί σε διάφορα είδη ψαριών. Ο βαθμός δραστικότητας της δέσμευσης IgE μπορεί να σχετίζεται με την ποσότητα του ιχθυηρού που καταναλώνεται.



Εικόνα 3: Η επιφάνεια του αλλεργιογόνου που επιδρά με το IgE αντίσωμα ονομάζεται επίτοπο. Τα επίτοπα μπορεί να είναι διαδοχικά, που σημαίνει ότι το αντίσωμα αντιδρά με ένα γραμμικό πεπτίδιο μήκους 8-10 αμινοξέων, ή διατεταγμένα, γεγονός που συνεπάγεται ταυτόχρονη αλληλεπίδραση με αμινοξέα από διαφορετικά τμήματα της γραμμικής ακολουθίας. Τα διατεταγμένα επίτοπα καταστρέφονται όταν η δομή του αλλεργιογόνου μεταβάλλεται, ενώ τα διαδοχικά όχι (Sampson, 2004).

Η παρβαλβουμίνη είναι ανθεκτική στη γαστρεντερική πέψη και μπορεί να βρεθεί στον ορό του αίματος μόλις 10 λεπτά μετά την κατάποση. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να εξηγήσουν την ταχεία αλλεργική αντίδραση μετά από την κατανάλωση ψαριών σε ορισμένους ασθενείς αλλεργικούς στα ιχθυρά. Η πιο σοβαρή και συχνή αιτία της IgE-μεσολαβούμενης αλλεργίας έναντι των ιχθυηρών είναι ένα θανατηφόρο αναφυλακτικό σοκ. Ωστόσο, με βάση τον εκτενή χαρακτηρισμό των παρβαλβουμινών στα ψάρια, παρασκευάστηκε μια μεταλλαγμένη υποαλλεργική παρβαλβουμίνη κυπρίνου, εισάγοντας

μεταλλάξεις μέσα στους τομείς δέσμευσης ασβεστίου. Ένα τέτοιο "κατασκευασμένο" υποαλλεργιογόνο θα μπορούσε να αποδειχθεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την αντιμετώπιση της IgE-μεσολαβούμενης αλλεργίας σε ασθενείς αλλεργικούς στα ιχθυηρά.

5.3 ΥΠΟΛΟΙΠΑ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ

Εκτός από την παρβαλβουμίνη που αποτελεί το κυριότερο αλλεργιογόνο στα ψάρια, οι Hamada et al. (2001) προσδιόρισαν ένα υψηλότερου μοριακού βάρους αλλεργιογόνο στο μυοστρωματικό πρωτεϊνικό κλάσμα του μυός του μεγάλου φθαλμου τόνου. Το αλλεργιογόνο αυτό φαίνεται να έχει ως βάση το κολλαγόνο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, ανοσοαποτύπωσης και ανάλυσης των αμινοξέων. Σε αυτή τη μελέτη, το IgE του ορού ασθενών αλλεργικών στα ψάρια αναγνώρισε δύο πρωτεϊνικές ζώνες των 120 kDa, και μία ζώνη των 240 kDa που αντιστοιχούσε στην α -αλυσίδα και β -αλυσίδα (διμερές της α -αλυσίδας) του κολλαγόνου, αντίστοιχα (Hamada et al., 2001). Αν και η διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των κολλαγόνων από διαφορετικά είδη ψαριών είναι κοινή, υπάρχει έλλειψη διασταυρούμενης αντιδραστικότητας μεταξύ των κολλαγόνων από ψάρια και άλλα ζώα (Hamada et al., 2003b).

Η ζελατίνη των ψαριών αποτελείται από κολλαγόνο που προέρχεται από το δέρμα και τα οστά ψαριών και χρησιμοποιείται συνήθως ως σταθεροποιητής σε φαρμακευτικά προϊόντα και τρόφιμα (Taylor et al., 2004). Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει το αλλεργιογόνου δυναμικό της ζελατίνης ψαριών. Οι Sakaguchi et al. (2000) έδειξαν ότι οι ασθενείς με αλλεργία στα ψάρια και στη ζελατίνη βοοειδών είχαν ειδικά IgE αντισώματα που αντιδρούσαν στη ζελατίνη, ιδίως στις αλυσίδες α -1 και α -2 του κολλαγόνου τύπου I, του τόνου. Επιπλέον, ήταν εμφανής η διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ ζελατινών από διαφορετικά είδη ψαριών, όπως ο τόνος, ο σολομός, το σκουμπρί και ο βακαλάος (Sakaguchi et al., 2000). Οι André et al. (2003) ανέφεραν ότι 3 στους 100 ορούς από άτομα αλλεργικά στα ψάρια έδειξαν δραστηριότητα στη σάρκα και το δέρμα τόνου, καθώς και στη ζελατίνη που παρασκευάστηκε από δέρμα τόνου, κατά την ανοσοαποτύπωση. Εντούτοις, καμία διασταυρούμενη αντίδραση δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ ζελατινών των βοοειδών/ χοίρων και των ψαριών. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι τα 3 άτομα δεν είχαν καμία κλινική δραστηριότητα στη ζελατίνη του δέρματος τόνου. Μια νεότερη έρευνα αποκάλυψε ότι 1 στα 30 άτομα με κλινική αλλεργία στο μπακαλιάρο εμφάνισαν ήπια αντίδραση μετά την κατάποση μιας αθροιστικής δόσης 7,61g ζελατίνης από δέρμα

μπακαλιάρου. Οι Hansen et al. (2004) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το 90% των αλλεργικών στα ψάρια καταναλωτών δεν αντιδρούν μετά την κατάποση αθροιστικής δόσης 3,61g ζελατίνης ψαριών, με στατιστική βεβαιότητα 95%.

Εκτός του κολλαγόνου, υπάρχουν ενδείξεις και για άλλα, ήσσονος σημασίας αλλεργιογόνα στα ψάρια. Οι Do y et al. (1998), χρησιμοποιώντας τη συνένωση ορών από 12 άτομα αλλεργικά στο γάδο, έδειξαν ότι τα προ της νεκρικής ακαμψίας εκχυλίσματα του γάδου περιείχαν 7 IgE-συνδεόμενες και πιθανώς αλλεργιογόνες πρωτεΐνες, με μοριακά βάρη 12, 22, 30, 45, 60, 67, 104, και 130 kDa. Υψηλότερο περιεχόμενο IgE-δραστικών ζωνών παρατηρήθηκε όταν ο γάδος συντηρήθηκε για μεγαλύτερο διάστημα. Οι Galland et al. (1998) απομόνωσαν μία πρωτεΐνη βάρους 41 kDa από το ακατέργαστο εκχύλισμα νωπού γάδου. Η καθαρή πρωτεΐνη θεωρήθηκε ως αλλεργιογόνο, λόγω της ικανότητάς της να δεσμεύει τα αντισώματα IgE από τους συνενωμένους ορούς ατόμων αλλεργικών στο γάδο και επιπλέον να αναγνωρίζει 5 ακόμα αλλεργιογόνες πρωτεΐνες στα ακατέργαστα εκχυλίσματα γάδου, με μοριακή μάζα 13, 22, 28, 49 και 60 kDa. Μεταγενέστερη μελέτη διαπίστωσε ότι η 41 kDa- πρωτεΐνη ήταν ομόλογη προς την αφυδρογονάση φωσφορικής αλδεϋδης. Επιπλέον, η 41 kDa-πρωτεΐνη αναγνωρίστηκε από μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-παρβαλβουμίνης, γεγονός που κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην ομοιότητα της 41 kDa-πρωτεΐνης με τα όξινα κατάλοιπα των τομέων δέσμευσης ασβεστίου της παρβαλβουμίνης (Das Dore et al., 2002β). Οι Lim et al. (2008) ανέφεραν ότι οι οροί 2 εκ των 10 ατόμων με αλλεργία στα τροπικά ψάρια, έδειξαν IgE-πρόσδεση σε πρωτεΐνες 29 και 54 kDa, περαν της 12 kDa-παρβαλβουμίνης του γάδου.

Ενώ η πλειοψηφία των μελετών έδειξε ότι τα αλλεργικά στα ιχθυηρά άτομα αντιδρούν κυρίως στην παρβαλβουμίνη, αυτό δεν συμβαίνει πάντοτε. Οι Kelso et al. (1996) και James et al. (1997) ανέφεραν 2 άτομα με επιλεκτική αλλεργία, τα οποία έδειξαν IgE-αντιδραστικότητα μόνο σε μια πρωτεϊνική ζώνη 25 kDa στον ξιφία και 40 kDa στον τόνο. Μια ερευνητική ομάδα στην Ινδία συνέκρινε τα προφίλ των αλλεργιογόνων σε δύο ινδικά ψάρια: φρίσσα και ψευδολίτσα (καστανόψαρο) (Das et al., 2005). Η IgE-ανοσοαποτύπωση έδειξε ότι οι οροί από 10 ασθενείς αλλεργικούς στα ψάρια αντέδρασαν στις πρωτεϊνικές ζώνες που κυμαίνονταν από 29 έως 94 kDa και από 32 έως 97 kDa, στα εκχυλίσματα νωπών μυών της φρίσσας και ψευδολίτσας, αντίστοιχα (Das et al., 2005). Οι οροί των ασθενών συνδέονταν επίσης σε μια κοινή πρωτεΐνη 50 kDa και στα δύο εκχυλίσματα

ψαριών, αλλά κανένας από τους ορούς δεν έδειξε σύνδεση με το χαμηλού μοριακού βάρους αλλεργιογόνο, δηλαδή την παρβαλβουμίνη, υποδηλώνοντας ότι τα επίτοπα στις πρωτεΐνες αυτών των ψαριών είναι εξειδικευμένα στο είδος (Das et al., 2005). Ωστόσο, δεν πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό αυτών των εν δυνάμει αλλεργιογόνων. Σε μεταγενέστερη μελέτη ερευνήθηκαν οι IgE-δεσμευτικές ιδιότητες τεσσάρων θερμικά επεξεργασμένων ψαριών και αποκαλύφθηκε ότι το τηγάρισμα και το βράσιμο των μυών των ψαριών κατήργησε τη δέσμευση των IgE αντισωμάτων των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στη φρίσσα και τη ψευδολίτσα, ενώ η αλλεργιογόνος πρωτεΐνη στο ινδικό σκουμπρί ήταν θερμικά σταθερή (Chatterjee et al., 2006).

Πρόσφατα, οι Liu et al. (2011a) ταυτοποίησαν δύο υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες στην αμβλύρυγχο τσιπούρα ως 47 kDa ενολάση και 41 kDa κινάση της κρεατίνης, εφαρμόζοντας ηλεκτροφόρηση 2 διαστάσεων, σε συνδυασμό με την IgE-ανοσοαποτύπωση και φασματομετρία μάζας. Η μελέτη αυτή δεν απέδειξε σύνδεση της IgE στην παρβαλβουμίνη της αμβλύρυγχου τσιπούρας.

Πρόσφατα ερευνήθηκαν και άλλα σημαντικά αλλεργιογόνα ιχθυηρά, όπως τα καρκινοειδή (ιδιαίτερα η γαρίδα) και ορισμένα ακόμη είδη ψαριών. Τρεις διαφορετικές ερευνητικές ομάδες έχουν προσδιορίσει ότι το κύριο αλλεργιογόνο της γαρίδας είναι η μυϊκή πρωτεΐνη τροπομοσίνη (Daul et al., 1993a, 1993b, 1994. Shanti et al., 1993. Leung et al., 1994). Μεταγενέστερες μελέτες έχουν υποδείξει ότι η τροπομοσίνη είναι επίσης το κύριο αλλεργιογόνο και σε άλλα καρκινοειδή, όπως ο αστακός (Leung et al., 1998a. Mykles et al., 1998) και ο κάβουρας (Leung et al., 1998b), καθώς και σε έντομα όπως η κατσαρίδα (Santos et al., 1999. Asturias et al., 1999), και αραχνοειδή όπως το άκαρι (ακάρεα) (Aki et al., 1995). Αλλεργιογόνες τροπομοσίνες έχουν επίσης προσδιοριστεί σε μαλάκια (Leung et al., 1996), όπως τα καλαμάρια (Miyazawa et al., 1996), τα στρείδια (Ishikawa et al., 1998a), τα σαλιγκάρια (Ishikawa et al., 1998b), τα μύδια, οι αχιβάδες και τα χτένια (Chu et al., 2000).

Οι μελέτες πάνω στα αλλεργιογόνα της γαρίδας ξεκίνησαν πολλά χρόνια πριν, με έρευνες από τον Daul και τους συνεργάτες του, οι οποίοι απέδειξαν ότι το κύριο αλλεργιογόνο της γαρίδας είναι μια 36-kDa πρωτεΐνη με την οποία αντιδρά πάνω από το 80% των αλλεργικών στη γαρίδα ατόμων. Μια ανάλυση ανοσοαποτύπωσης δύο διαφορετικών ειδών

γαρίδας, των *Penaeus aztecus* και *Penaeus setiferus* (πρόσφατα ταξινομήθηκαν ως *Farfantepenaeus aztecus* και *Litopenaeus setiferus*, αντίστοιχα) σε μαγειρεμένη και μη-μαγειρεμένη μορφή, επιβεβαίωσε ότι το κύριο αλλεργιογόνο είναι η 36-kDa πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη αυτή δεν παρουσιάστηκε μόνο σε εκχυλίσματα σάρκας γαρίδας αλλά και στο υγρό στο οποίο είχε βράσει η γαρίδα. Η ομολογία γνωστών αλληλουχιών αμινοξέων, έτσι όπως προκύπτει από την αλληλουχία των αμινοξέων του συμπληρωματικού DNA, απέδειξε ότι αυτό το μόριο ήταν όντως η πρωτεΐνη τροπομοσίνη της σάρκας του ιχθυηρού. Η τροπομοσίνη είναι το μόνο κύριο αλλεργιογόνο στα διάφορα είδη γαρίδας που έχουν ερευνηθεί, όπως τα *Penaeus aztecus* και *Penaeus indicus* (τόρα ονομάζονται *Fenneropenaeus indicus* και *Metapenaeus ensis*, αντίστοιχα) (Daul et al., 1993b. Shanti et al., 1993. Leung et al., 1994), και ο απολογισμός είναι ότι περισσότερο από 84% του συνόλου των IgE αντισωμάτων αντιδρά με αυτήν στα άτομα με αλλεργία στη γαρίδα (Morgan et al., 1990).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

6.1 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Η ύπαρξη αλλεργιογόνων σε τρόφιμα αποτελεί σημαντικό πρόβλημα παγκοσμίως, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, οι τροφικές αλλεργίες αποτελούν την 4^η μεγαλύτερη πηγή ανησυχίας. Η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα αλλεργιογόνα βασίζεται σήμερα στην Οδηγία 2000/13/ΕΚ σχετικά με την επισήμανση τροφίμων και τις μεταγενέστερες τροποποιήσεις της. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή διαπιστώνοντας τη διόγκωση του προβλήματος της εμφάνισης τροφικών αλλεργιών τα τελευταία χρόνια, εξέδωσε στις 10 Νοεμβρίου 2003 την Οδηγία 89 του 2003, η οποία τέθηκε σε εφαρμογή από τις 25 Νοεμβρίου 2004 και ενσωματώθηκε στον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών από τον Απρίλιο του 2005. Με βάση την οδηγία αυτή ο παραγωγός ή τυποποιητής τροφίμων είναι υποχρεωμένος να επισημαίνει στη συσκευασία των τροφίμων που παράγει, τυχόν ύπαρξη συστατικών που δύνανται να προκαλέσουν αλλεργίες και θεσπίζει τον κατάλογο των τροφίμων που πρέπει απαραίτητα να αναφέρονται στο παράρτημα ΙΙΙ της ως άνω οδηγίας (τα 12 βασικά αλλεργιογόνα):

- Σιτηρά που περιέχουν γλουτένη ή προϊόντα προερχόμενα από αυτά
- Οστρακόδερμα (αστακοί, γαρίδες, καβούρια και προϊόντα τους)
- Αυγά και προϊόντα με βάση τα αυγά
- Ψάρια και προϊόντα με βάση τα ψάρια (εκτός από:
 - α. ζελατίνη ψαριών που χρησιμοποιείται ως φορέας σκευασμάτων βιταμινών ή καροτενοειδών
 - β. ζελατίνες ψαριών ή ιχθυόκολλα που χρησιμοποιείται ως διαλυτικό μέσο σε μπίρες και οίνους)
- Αραχίδες και προϊόντα τους
- Σόγια και προϊόντα της

- Γάλα και γαλακτοκομικά, συμπεριλαμβανομένης της λακτόζης [η ευαισθησία των ασθενών που είναι αλλεργικοί στο γάλα οφείλεται κατά κύριο λόγο στην β-γαλακτοσφαιρίνη (66-82%) και κατά δεύτερο λόγο στην καζεΐνη (43-57%)]
- Ξηροί καρποί
- Σέλινο και προϊόντα του
- Μουστάρδα και προϊόντα της
- Σουσάμι και προϊόντα του
- Διοξείδιο του θείου και θειώδεις ενώσεις σε συγκεντρώσεις άνω των 10 ppm.

Η οδηγία που ισχύει μέχρι σήμερα είναι η 2007/68/EK που τροποποιεί την οδηγία 2000/13/EK όσον αφορά στην ένδειξη αλλεργιογόνων συστατικών που υπάρχουν στα τρόφιμα και θεσπίζει τον κατάλογο των τροφίμων που πρέπει απαραίτητα να αναφέρονται στο παράρτημα IIIα και αυξάνει τον αριθμό αλλεργιογόνων σε 14 με την προσθήκη των:

- Λούπινο και προϊόντα με βάση το λούπινο
- Μαλάκια και προϊόντα με βάση τα μαλάκια

Η Οδηγία 2006/142/EK ασχολείται σχετικά με τη βελτίωση του παραρτήματος IIIα της οδηγίας 2000/13/EK όπως τροποποιήθηκε από την οδηγία 2003/89/EK και παραθέτει τα συστατικά τα οποία πρέπει υπό οποιεσδήποτε συνθήκες να αναγράφονται στην ετικέτα των τροφίμων, ενώ βάζει ποσοτικά όρια σε κάποια από αυτά, που ακόμα και τα ίχνη τους αν υπάρχουν σε συσκευασμένα προϊόντα, πρέπει να επισημαίνονται. Τρόφιμα τα οποία δεν συμμορφώνονται προς τις υποδείξεις της Οδηγίας 89/2003 δεν επιτρέπεται να κυκλοφορούν, μετά την 25η Νοεμβρίου. Πάντως, η νομοθεσία δεν καλύπτει αλλεργιογόνα τρόφιμα τα οποία μπορεί να προέκυψαν ως αποτέλεσμα μη σκοπούμενης επιμόλυνσης που συνέβη σε κάποιο στάδιο της παραγωγής ή της μεταφοράς του τροφίμου. Επομένως, οι παραγωγοί χρησιμοποιούν προειδοποιητικές επισημάνσεις («μπορεί να περιέχει» αλλεργιογόνο) στις ετικέτες των τροφίμων για την προστασία των καταναλωτών. Οι επισημάνσεις αυτές διασφαλίζουν την προστασία της υγείας του καταναλωτή, όμως μειώνουν δραστικά την ποικιλία των διαθέσιμων τροφίμων για τους αλλεργικούς. Για την μείωση της ανάγκης προειδοποιητικών επισημάνσεων απαιτούνται επαρκείς γνώσεις για την υγιεινή του χώρου παραγωγής και τον καθαρισμό του εξοπλισμού.

6.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ- ΝΕΟ ISO ΠΡΟΤΥΠΟ

Το Μάρτιο του 2007, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης CEN (European Committee for Standardization) εξέδωσε σχέδιο το prEN ISO 15633 για ανίχνευση αλλεργιογόνων ουσιών στα τρόφιμα με ανοσοχημικές μεθόδους. Η επιτροπή σε πρώτη φάση επέλεξε τρία τρόφιμα με αλλεργιογόνο δράση για να κάνει συγκριτική αξιολόγηση των εμπορικών kits που ανιχνεύουν την υπολειμματικότητά τους (φουντούκι, φιστίκι, αυγό). Το ISO 15634-1 περιέχει ένα πρότυπο σχέδιο που παρέχει ένα γενικό πλαίσιο για την ανίχνευση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα αλλεργιογόνα είδη που περιέχονται, χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Σχετίζεται με τις απαιτήσεις για τη ενίσχυση των συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκού οξέος (DNA) στόχων και για την επιβεβαίωση της ταυτότητας της ενισχυμένης αλληλουχίας του νουκλεϊκού οξέος. Η τάση τα τελευταία χρόνια είναι να αναπτυχθούν κλασσικές χρωματογραφικές μέθοδοι ανάλυσης με παράλληλη χρήση φασματοφωτομετρίας. (Σειραγάκης 2008, Σειραγάκης FAL, Σωτηρούδης 2005)

6.3 ΚΑΤΩΤΕΡΑ ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Η σημασία των τροφικών αλλεργιών ως ζήτημα δημόσιας υγείας και ασφάλειας των τροφίμων έχει επιβάλει στην βιομηχανία και στις ρυθμιστικές αρχές την ανάγκη για την επιβολή κατώτατων ορίων ανίχνευσης αλλεργιογόνων. Το κατώτατο όριο μιας αλλεργιογόνου τροφής μπορεί να έχει διαφορετική σημασία για κάθε διαφορετικό φορέα. Ως τροφή για έναν αλλεργικό ασθενή, το κατώτατο όριο είναι η ελάχιστη ποσότητα η οποία απαιτείται για να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση. Το κατώτατο όριο του πληθυσμού θα μπορούσε να είναι η ποσότητα που απαιτείται για να προκληθεί αλλεργική αντίδραση στο πιο ευαίσθητο άτομο. Για τη βιομηχανία τροφίμων και τους ρυθμιστικούς φορείς ο όρος του κατώτατου ορίου θα μπορούσε να καθορίσει την ποσότητα του αλλεργιογόνου η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει ανάκληση προϊόντος, αν δεν επισημαίνεται ή το πότε θα μπορούσε να τοποθετηθεί συμβουλευτική επισήμανση σε περίπτωση ύπαρξης αλλεργιογόνου λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Remington B.C., 2013).

Δύο χώρες έχουν προσπαθήσει να ορίσουν τα κατώτατα όρια για αδήλωτα αλλεργιογόνα, αυτές είναι η Ελβετία και η Ιαπωνία. Η Ελβετία έχει ορίσει το κατώτατο όριο των

1000ppm για τα αλλεργιογόνα. Αν η μόλυνση κάποιου τροφίμου άνω των 1000ppm είναι αναπόφευκτη, αυτό θα πρέπει να αναγράφεται στην ετικέτα ως συστατικό, αλλά η μόλυνση κάτω αυτού του ορίου μπορεί είτε να δηλωθεί είτε όχι (Kerbach et al.2009). Βέβαια η ποσότητα των 1000ppm πρωτεΐνης μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση σε μέτρια επίπεδα κατανάλωσης σε πολλαπλά τρόφιμα (Taylor et al,2004). Η Ιαπωνία έχει ορίσει πιο αυστηρά επίπεδα κατώτατων ορίων αδήλωτων αλλεργιογόνων, ποσότητες μεγαλύτερες των 10ppm στα τρόφιμα πρέπει να δηλώνονται (Kerbach et al.2009). Οι ΗΠΑ, προς το παρόν, δεν έχουν υιοθετήσει νομοθεσία ή κανονισμούς σχετικά με τα κατώτατα όρια των τροφικών αλλεργιογόνων και δεν υπάρχουν ρυθμιστικές οδηγίες σχετικά με τα ίχνη των αλλεργιογόνων λόγω διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Λόγω της έλλειψης κανονισμών η βιομηχανία έχει εφαρμόσει σε ευρεία χρήση τη συμβουλευτική επισήμανση «μπορεί να περιέχει...», προσπαθώντας να διαχειριστεί τον κίνδυνο και να προστατεύσει τους καταναλωτές. Αυτή η συμβουλευτική, όμως, επισήμανση μειώνει την ποιότητα ζωής των αλλεργικών ασθενών που ακολουθούν δίαιτες αποφυγής και πολλοί από αυτούς αγνοούν την επισήμανση αυξάνοντας τον κίνδυνο (Hefle et al.,2007, Hourihane ,2011).

6.4 ΘΕΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ

Η Βιομηχανία Τροφίμων οφείλει να προστατέψει τους αλλεργικούς καταναλωτές και αυτό επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: ο πρώτος είναι η σωστή ενημέρωση του καταναλωτή και ο δεύτερος η διασφάλιση, ότι τα αλλεργιογόνα συστατικά σε ένα προϊόν είναι σε τέτοια κατώτατα επίπεδα που δεν μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο.

Η πληροφόρηση των καταναλωτών παρέχεται με τη σωστή επισήμανση. Γι αυτό το λόγο πρέπει να χρησιμοποιούνται όροι οι οποίοι είναι κατανοητοί από τον απλό καταναλωτή και όχι τεχνικοί και δυσνόητοι.

Όσο αφορά το δεύτερο τρόπο προστασίας οι κατασκευαστές τροφίμων θα πρέπει να αποφεύγουν την ακούσια παρουσία των αλλεργιογόνων στα τρόφιμα. Για αυτό το λόγο, θα πρέπει να εξετάζεται: Α) η καινοτομία, η ανάπτυξη του προϊόντος πρέπει να βασίζεται σε συνταγή που ελαχιστοποιεί τους κινδύνους εμφάνισης αλλεργιογόνων παραγόντων και θα πρέπει να εξετάζεται εκτενώς αν η χρήση αλλεργιογόνου είναι απαραίτητη ή αν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα ισοδύναμο συστατικό μη αλλεργιογόνο. Β) την

παραγωγική διαδικασία και συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό των πιθανών κινδύνων από αλλεργιογόνα κατά την παραγωγική διαδικασία, η βιομηχανία οφείλει να διασφαλίζει ότι οι κίνδυνοι ελαχιστοποιούνται στα υλικά που χρησιμοποιεί για την παραγωγή ενός τροφίμου (α' ύλες, χρωστικές, αρωματικές ύλες), στα υλικά συσκευασίας και στα υπολείμματα που έχουν μείνει στη γραμμή παραγωγής από προηγούμενο προϊόν. Οι κίνδυνοι σχετίζονται όχι μόνο με τα υλικά, αλλά και με το κτίριο, τα μηχανήματα, τα εργαλεία, τους εργαζομένους και τα μέσα μεταφοράς. Με βάση και τις αρχές του HACCP, η Βιομηχανία Τροφίμων καλείται ειδικότερα να:

1. εντοπίζει οποιονδήποτε κίνδυνο μπορεί να προβλεφθεί, εξαλειφθεί ή μειωθεί σε αποδεκτά επίπεδα
2. προσδιορίζει τα κρίσιμα σημεία ελέγχου (ccp)
3. καθιερώνει όρια, πέραν των οποίων η παρουσία αλλεργιογόνων παραγόντων συνιστά κίνδυνο
4. διαπιστώνει τα τυχόν προβλήματα στα ccp
5. αναλαμβάνει διορθωτικές ενέργειες
6. επιβεβαιώνει ότι οι ως άνω ενέργειες είναι αποτελεσματικές.

Γ) τη συσκευασία, την προώθηση και την διαφήμιση, η συσκευασία φέρει την ετικέτα και επομένως την πληροφόρηση των καταναλωτών, γι αυτό θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι η πληροφορία θα μείνει στο προϊόν, επιπλέον οποιαδήποτε αλλαγή στη σύσταση θα πρέπει να γίνεται γνωστή στους καταναλωτές ειδικά εάν περιλαμβάνει αλλεργιογόνο συστατικό το οποίο δεν υπήρχε παλαιότερα (food standards agency, 2005).

Το 2005, στην Αυστραλία, ιδρύθηκε η 1^η ένωση αλλεργιογόνων (Allergen Bureau) με πρωτοβουλία της Αυστραλιανής υπηρεσίας τροφίμων και του συμβουλίου καταστηματάρχων (AFGC, Australian Food and Grocer Council) για την παροχή πληροφοριών, πρακτικών εργαλείων και επαφών στη βιομηχανία, για τη βελτίωση της των αλλεργιογόνων τροφίμων και των παραγώγων συστατικών. Το 2007 εκδόθηκε ο πρώτος οδηγός της βιομηχανίας τροφίμων για την διαχείριση των αλλεργιογόνων και την επισήμανση τους. Ο στόχος του οδηγού της βιομηχανίας είναι να προωθηθεί η δήλωση των αλλεργιογόνων συστατικών στις ετικέτες των τροφίμων, με σαφή τρόπο. Ο οδηγός συνιστά: α) όλες οι πληροφορίες για τα αλλεργιογόνα θα πρέπει να ομαδοποιούνται για να

μπορούν να εντοπίζονται εύκολα, β) η περιγραφή του προϊόντος δεν θα πρέπει να είναι παραπλανητική, γ) τα αλλεργιογόνα πρέπει να δηλώνονται με απλές λέξεις σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων, δ) το μέγεθος της εκτύπωσης θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο και ευανάγνωστο και ε) η θέση τοποθέτησης των αλλεργιογόνων στην ετικέτα θα εξαρτάται από τη συνολική παρουσίαση των πληροφοριών ώστε να βρίσκεται σε ευδιάκριτο σημείο (Food Standards Australia New Zealand, 2010).

6.5 ΚΩΔΙΚΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΠΟΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΩΝ ΚΟΙΝΗΣ ΧΡΗΣΗΣ

ΓΕΝΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

ΑΡΘΡΟ 92

Χαρακτηρισμός και διάκριση

1. «Ιχθυηρά» χαρακτηρίζονται γενικά τα θαλάσσια, λιμναία ή ποταμίσια ζώα που δεν είναι θερμόαιμα. Ως κρέας αυτών δε χαρακτηρίζεται κάθε εδώδιμο μέρος τους.
2. Τα ιχθυηρά διακρίνονται σε νωπά και διατηρημένα ιχθυηρά, ειδικότερα δε στις εξής κατηγορίες:
 - a) Καπνιστά ψάρια
 - b) Νωπά ιχθυηρά
 - c) Κατεψυγμένα ιχθυηρά
 - d) Αποξηραμένα ψάρια
 - e) Αλίπαστα ψάρια
 - f) Ιχθυηρά σε ξύδι, άλμη ή έλαιο
 - g) Διατηρημένα αυγά ψαριών
 - h) Διάφορα σκευάσματα ιχθυηρών
3. Τα διατηρημένα ιχθυηρά και τα προϊόντα τους πρέπει να πληρούν όλους τους σχετικούς όρους που αφορούν τα «Διατηρημένα Τρόφιμα».
4. Απαγορεύεται η τεχνητή χρώση και αρωματισμός με οποιονδήποτε τρόπο και μέθοδο όπως και η προσθήκη συντηρητικών ουσιών στα νωπά και διατηρημένα ιχθυηρά και

προϊόντα τους, εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρονται ρητά στο κεφάλαιο του κώδικα.

5. Τα διατηρημένα ιχθυηρά και προϊόντα τους πρέπει να έχουν υποστεί τέτοια επεξεργασία, ώστε να μην περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς ή τοξίνες αυτών.

ΑΡΘΡΟ 93

Νωπά και κατεψυγμένα Ιχθυηρά

1. «Νωπά Ιχθυηρά», χαρακτηρίζονται τα ιχθυηρά που διατίθενται αμέσως μετά την αλιεία ή συσκευάζονται μέσα σε τριμμένο πάγο και έτσι φέρονται στην κατανάλωση.
2. Για τα νωπά και κατεψυγμένα ιχθυηρά όπως και για τα αλιευτικά πλοία, εφαρμόζονται οι διατάξεις που ισχύουν κάθε φορά, των αρμόδιων Υπηρεσιών.
3. Τα νωπά και κατεψυγμένα ιχθυηρά δεν επιτρέπεται να περιέχουν πρόσθετες χρωστικές ουσίες.
4. α) Επιτρέπεται η χρήση πρόσθετων του αντίστοιχου παραρτήματος III του Κώδικα Τροφίμων: Ασκορβικά E300, E301, E302, κιτρικά E330, E331, E332, E333 σε μη επεξεργασμένα ψάρια, καρκινοειδή και μαλάκια, συμπεριλαμβανομένων των κατεψυγμένων και υπερκατεψυγμένων σύμφωνα με τους όρους του παραρτήματος του εν λόγω άρθρου.

β) Επιτρέπεται η χρήση πρόσθετων του αντίστοιχου παραρτήματος III του Κώδικα Τροφίμων, Συντηρητικά και αντιοξειδωτικά του ίδιου άρθρου, σύμφωνα με τους αντίστοιχους όρους: 1) Θειώδη E220, E221, E222, E223, E224, E226, E227, E228 σε καρκινοειδή και κεφαλόποδα, i) νωπά, κατεψυγμένα και υπερκατεψυγμένα, ii) καρκινοειδή των οικογενειών *Penaeidae*, *Solenoceridae*, *Aristaeidae*, 2) Ερυθροβικό οξύ E315, ερυθροβικό νάτριο E316 σε κατεψυγμένα και υπερκατεψυγμένα ψάρια με ερυθρό δέρμα. 3) 4-Εξυλορεσορκινόλη E586 σε νωπά, κατεψυγμένα και υπερκατεψυγμένα καρκινοειδή.
- γ) Επιτρέπεται η χρήση πρόσθετων του αντίστοιχου παραρτήματος IV του Κώδικα Τροφίμων του ίδιου άρθρου σύμφωνα κατά περίπτωση με τους αντίστοιχους όρους: 1) Φωσφορικά E338, E339, E340, E341, E343, E450, E451, E452 σε i)

κατεψυγμένα και υπερκατεψυγμένα φιλέτα μη επεξεργασμένων ψαριών ii) κατεψυγμένα και υπερκατεψυγμένα μη επεξεργασμένα και επεξεργασμένα προϊόντα καρκινοειδών και μαλακίων, 2) Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό ασβέστιο νάτριο E385 σε κατεψυγμένα και υπερκατεψυγμένα καρκινοειδή, 3) Πολυόλες E420, E421, E953, E965, E966, E967, E968 σε κατεψυγμένα και υπερκατεψυγμένα ανεπεξέργαστα ψάρια, καρκινοειδή, μαλάκια και κεφαλόποδα.

ΑΡΘΡΟ 99

Διάφορα σκευάσματα Ιχθυηρών

Με την ονομασία «διάφορα σκευάσματα ιχθυηρών» χαρακτηρίζονται οι παρακάτω κατηγορίες:

A) Εκχυλίσματα ιχθυηρών

B) Οποί ιχθυηρών

Γ) Σούπα και ζωμοί ιχθυηρών

Δ) Ζωμοί ιχθυηρών

E) Πολτοί ιχθυηρών

Στ) Κρέατα ιχθυηρών με ή χωρίς άλλα τρόφιμα.

Στο εν λόγω παράρτημα αναφέρονται αναλυτικά τα όσα προϊόντα, πρόσθετα και συντηρητικά επιτρέπονται και με ποιόν τρόπο πρέπει να διεκπεραιώνεται η χρήση τους όπως και άνωθεν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR, POLYMERASE CHAIN REACTION)

Η μέθοδος PCR είναι μία απλή και γρήγορη τεχνική βασισμένη στο πρότυπο αντιγραφής DNA, που επιτρέπει τη δημιουργία απεριόριστων αντιγράφων γενετικού υλικού από ένα μόνο κύτταρο. Η τεχνική περιγράφηκε και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1985 και σήμερα θεωρείται μια από τις σημαντικότερες επιστημονικές ανακαλύψεις της δεκαετίας και έχει αλλάξει, με επαναστατικό τρόπο, τη μελέτη του DNA. Ο εφευρέτης της μεθόδου (Kary Mullis) τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας το 1993. Με την τεχνική αυτή αντιγράφεται *in vitro*, κατά εκατομμύρια φορές, ένα τμήμα γονιδιακού δεοξυριβονουκλεοϊκού οξέος (DNA) οποιασδήποτε προέλευσης. Πρόκειται δηλαδή για μία ενζυμική μέθοδο σύνθεσης γονιδιακού DNA. Η τεχνική έχει αποδειχτεί εξαιρετικά χρήσιμη σε πολλές εφαρμογές όπως: ποσοτική μέτρηση RNA ή DNA, Κλινική Μικροβιολογία, Γενετική Διαγνωστική, Ανάλυση πληθυσμών, Αρχαιολογία, Ιατροδικαστική, Κλωνοποίηση, Χαρακτηρισμός αγνώστων μεταλλάξεων, Πολλαπλασιασμός αγνώστων αλληλουχιών, Ανάλυση γενώματος.

Για την ευκολότερη κατανόηση του τρόπου αντιγραφής του DNA με τη μέθοδο PCR θεωρείται σκόπιμο να δοθούν μερικά στοιχεία που αφορούν τη μοριακή δομή του DNA και τον τρόπο αντιγραφής του *in vivo*.

Τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) είναι μακρομόρια, που αποτελούνται από χιλιάδες απλούστερες δομικές μονάδες, τα νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μια αζωτούχο βάση, ένα μόριο μονοσακχαρίτη και ένα μόριο φωσφορικού οξέος. Οι αζωτούχες βάσεις είναι οι : αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C), θυμίνη (T), ουρακίλη (U).

Τα νουκλεοτίδια συνδέονται μεταξύ τους με 3',5'- φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και σχηματίζουν μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Το μόριο του DNA, συγκεκριμένα, είναι δίκλωνο, δηλαδή αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες (κλώνους), που ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται ανάμεσα στις βάσεις της μιας αλυσίδας με τις αντίστοιχες βάσεις της άλλης,

δημιουργώντας ζεύγη βάσεων. Η αδενίνη ενώνεται πάντα με τη θυμίνη, η γουανίνη με την κυτοσίνη, γι'αυτό ονομάζονται συμπληρωματικές. Σε καθεμία αλυσίδα υπάρχουν δυο ελεύθερα άκρα, ένα 3'- υδροξυλικό (3'- OH ή 3') και ένα 5'- φωσφορικό (5'- P ή 5'), τα οποία καθορίζουν την κατεύθυνση αντιγραφής. Το 3'- OH άκρο έχει ελεύθερη υδροξυλική ομάδα, ενώ το 5'- P έχει ελεύθερη φωσφορική ομάδα. Οι δύο αλυσίδες είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους και αντιπαράλληλες, δηλαδή οι 3',5'- φωσφοδιεστερικοί δεσμοί έχουν αντίθετη κατεύθυνση στους δύο κλώνους. Έτσι, η μια αλυσίδα ονομάζεται 5'-3' και η άλλη 3'-5'. Η κατεύθυνση της αντιγραφής είναι η 5'-3' και απαιτούνται :

- μονόκλωνη πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα, που θα χρησιμεύει ως πρότυπο (μήτρα) για την αντιγραφή
- ολιγονουκλεοτιδική αλυσίδα με 3'- OH άκρο, που θα χρησιμεύει ως αφετηρία (primer) για να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής
- το ένζυμο DNA πολυμεράση εξαρτημένη από DNA, το οποίο καταλύει την αντίδραση και
- 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια όλων των αζωτούχων βάσεων.

7.2 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Για την ανίχνευση των DNA αλληλουχιών, ένα τμήμα του αλληλικού γενώματος (DNA-πρότυπο ή DNA- μήτρα) με γνωστή αλληλουχία βάσεων, αντιγράφεται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση, κάτω από κατάλληλες συνθήκες κατά αρκετά εκατομμύρια φορές. Έτσι, η ποσότητα του DNA-πρότυπου πολλαπλασιάζεται εκθετικά μέσα σε λίγες ώρες. Η μεγάλη ποσότητα των αντιγράφων DNA, δηλαδή του προϊόντος της PCR όπως αυτά ονομάζονται, μπορεί στη συνέχεια να ταυτοποιηθεί και να υποστεί παραπέρα ανάλυση (π.χ. χαρτογράφηση γενώματος με ένζυμο περιορισμού (enzyme restriction analysis), εξακρίβωση της αλληλουχίας βάσεων (sequencing) κ.λπ.) (Mullis KB, 1987)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την *in vitro* αντιγραφή του DNA με τη μέθοδο PCR είναι ίδια με αυτά που περιγράφηκαν στην *in vivo* αντιγραφή. (Παπαναστασοπούλου Μ., 1997)

α) **Εκκινητές (primers)**. Ως εκκινητές χρησιμοποιούνται δύο μικρά μόρια (ζεύγος) ολιγονουκλεοτιδίων, που παρασκευάζονται τεχνητά με διάφορες μεθόδους. Καθεμιά έχει αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη που βρίσκεται στο 3'-OH άκρο των 2 αντί- παράλληλων αλυσίδων του DNA-προτύπου. Καθορίζουν τα άκρα του τμήματος που θα αντιγραφεί και αντιπροσωπεύουν τις περιοχές από τις οποίες θα ξεκινήσει η διαδικασία σύνθεσης αντιγράφων DNA. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη, γιατί το ένζυμο DNA πολυμεράση δεν είναι ικανό να συνθέσει εκ νέου καινούργια αλυσίδα DNA. Οι εκκινητές έχουν μήκος συνήθως 20-30 βάσεις και ελεύθερο 3'-OH άκρο. Επιπλέον, η θερμοκρασία μετουσίωσης- τήξης (melting temperature, T_m) του ενός εκκινητή πρέπει να είναι παραπλήσια με την T_m της δεύτερης και να κυμαίνεται μεταξύ 55° C και 80° C. Η T_m του κάθε εκκινητή εξαρτάται από την ποσοστιαία σύστασή της σε ζεύγη βάσεων κυρίως GC, αλλά και AT και βρίσκεται με διάφορους μαθηματικούς τύπους.

β) **DNA πολυμεράση**. Το ένζυμο DNA πολυμεράση δρα ως καταλύτης κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA *in vivo* και *in vitro*. Για να δράσει, απαιτεί την παρουσία μονόκλωνου DNA-προτύπου, καθώς και την παρουσία 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Καταλύει την προσθήκη μονονουκλεοτιδίων στο 3'άκρο των αφετηριών στην κατεύθυνση 5'-3' και κατ' αυτόν τον τρόπο οι εκκινητές επιμηκύνονται. Έτσι συνθέτονται δύο νέες αλυσίδες DNA, συμπληρωματικές προς τις πρότυπες. Τα τελευταία χρόνια, ως ένζυμο χρησιμοποιείται η θερμοανθεκτική Taq- DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση), που απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq).

γ) **Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)**. Τα τέσσερα 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP και dTTP) είναι ουσιώδη δομικά στοιχεία για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων. Προμηθεύουν τα μονονουκλεοτίδια που είναι απαραίτητα για την επιμήκυνση των αφετηριών, για την επίτευξη βέλτιστης ειδικότητας και πιστότητας σε υψηλούς ρυθμούς ενσωμάτωσης. Οι συγκεντρώσεις τους πρέπει να είναι από 20 έως

200μM για κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο και ισοδύναμες για κάθε ένα, για την ελαχιστοποίηση των λαθών.

δ) **Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης.** Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl (pH 8,3-8,9 στους 20⁰C), MgCl₂, KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη. Τα συστατικά αυτά υποβοηθούν τη διαδικασία αντιγραφής. Για παράδειγμα, το KCl διευκολύνει την ένωση των αφετηριών στο DNA-πρότυπο και ενισχύει τη δραστηριότητα της πολυμεράσης, ενώ τα ελεύθερα ιόντα Mg⁺⁺, το απορρυπαντικό (Tween 20) και οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητα για τη λειτουργία και τη σταθερότητα του ενζύμου, καθώς και την ενίσχυση της ειδικότητας και τη μεγαλύτερη παραγωγή του πολλαπλασιασθέντος προϊόντος (Oste, 1989).

Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται σε συγκεκριμένη συγκέντρωση σε κάθε νέα εφαρμογή της μεθόδου.

ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ

Η μέθοδος περιλαμβάνει συνεχώς επαναλαμβανόμενους κύκλους διαδοχικής αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας του μίγματος γενετικού υλικού και αντιδραστηρίων. Κάθε κύκλος ολοκληρώνεται σε τρία στάδια (Εικόνα 4). Η συσκευή του θερμοκυκλοποιητή ρυθμίζει αυτόματα την κατάλληλη, για κάθε στάδιο αντιγραφής θερμοκρασία, σύμφωνα με προεπιλεγμένο πρόγραμμα.

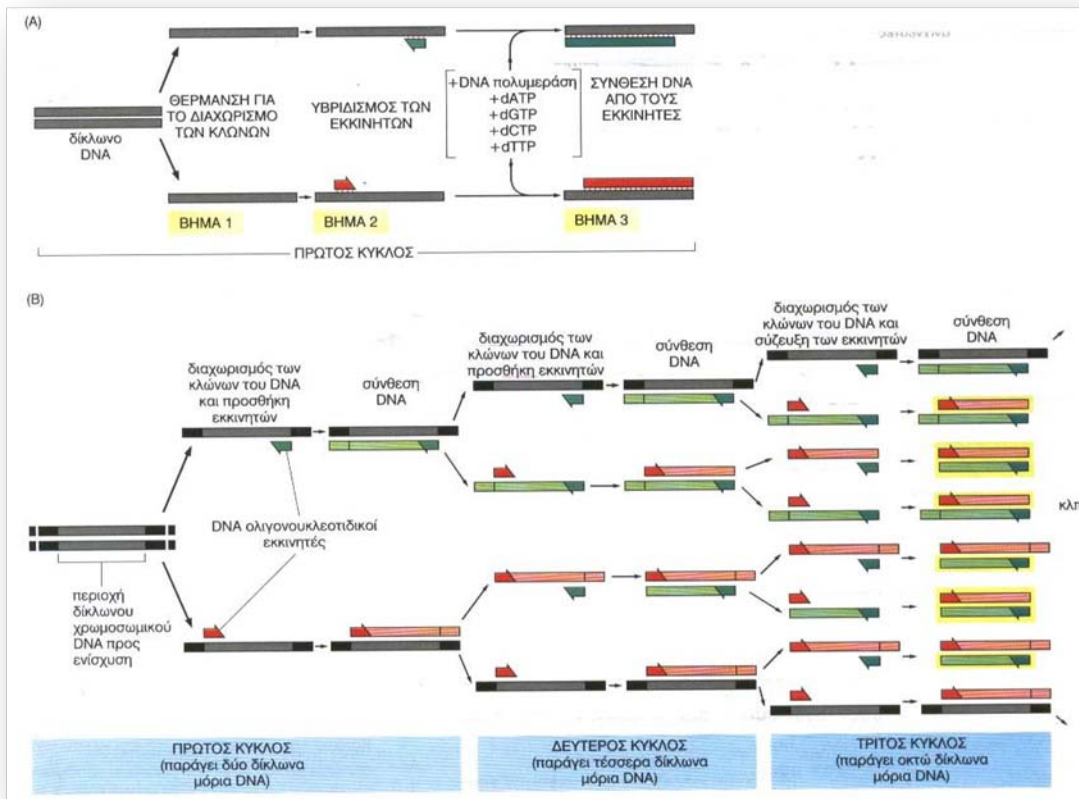
Στη συνέχεια περιγράφονται τα 3 στάδια αντιγραφής μιας τυπικής αντίδρασης και δίνεται ενδεικτικά για κάθε στάδιο η θερμοκρασία και ο χρόνος παραμονής του μίγματος σε αυτή. Φυσικά δεν είναι δυνατό να ακολουθηθεί πάντοτε με επιτυχία η ίδια για κάθε περίπτωση μεθοδολογία. Έτσι, σε κάθε νέα εφαρμογή της μεθόδου πιθανώς να απαιτείται προσδιορισμός της άριστης συγκέντρωσης των παραπάνω αντιδραστηρίων και κατάλληλη τροποποίηση των θερμοκρασιών σε σχέση με διάφορους παράγοντες που την επηρεάζουν, αλλά και σε σχέση με τον τύπο του θερμοκυκλοποιητή που χρησιμοποιείται. (Παπαναστασοπούλου Μ., 1997)

α) Στάδιο αποδιάταξης του δίκλωνου DNA- προτύπου (Denaturation). Το μίγμα θερμαίνεται στους 95 °C για 20 δευτερόλεπτα, ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου, που

συνδέουν τις δυο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Έτσι, προκύπτουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες, που υθα χρησιμεύσουν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 90 και 95⁰C.

β) Στάδιο υβριδισμού των εκκινητών στη μήτρα (Primer annealing). Η θερμοκρασία του μίγματος μειώνεται στους 55 ⁰C για 30 δευτερόλεπτα. Έτσι επιτυγχάνεται η ειδική ένωση των αφετηριών με τις συμπληρωματικές προς αυτές μονόκλωνες DNA αλυσίδες-μήτρα, που προέκυψαν στο πρώτο στάδιο. Οι εκκινητές εντοπίζουν το προς αντιγραφή τμήμα του DNA και προσανατολίζονται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το 5' άκρο της καθεμιάς να ενώνεται με το 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας-μήτρα. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 40 και 60 ⁰C. Η άριστη θερμοκρασία εξαρτάται από το μήκος των αφετηριών, από τη συγκέντρωσή τους στο μίγμα και από την T_m τους και επιλέγεται να είναι 5⁰C έως 10 ⁰C μικρότερη της T_m.

γ) Στάδιο σύνθεσης αντιγράφων DNA (Primer extension). Η θερμοκρασία αυξάνεται πάλι στους 72⁰C για 1 λεπτό και η Taq πολυμεράση, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις μονόκλωνες αρχικές DNA αλυσίδες, επιμηκύνει τις εκκινητές. Κατ' αυτόν τον τρόπο συνθέτονται δύο καινούργιες DNA αλυσίδες, με αποτέλεσμα το διπλασιασμό των δύο αρχικών. Η διαδικασία αντιγραφής εξελίσσεται, όπως προαναφέρθηκε, στην κατεύθυνση 5'-3', δηλαδή εντός των ορίων του τμήματος του γενώματος, το οποίο καθορίζουν οι δύο εκκινητές που αποτελούν και τα άκρα του. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 75 ⁰C.



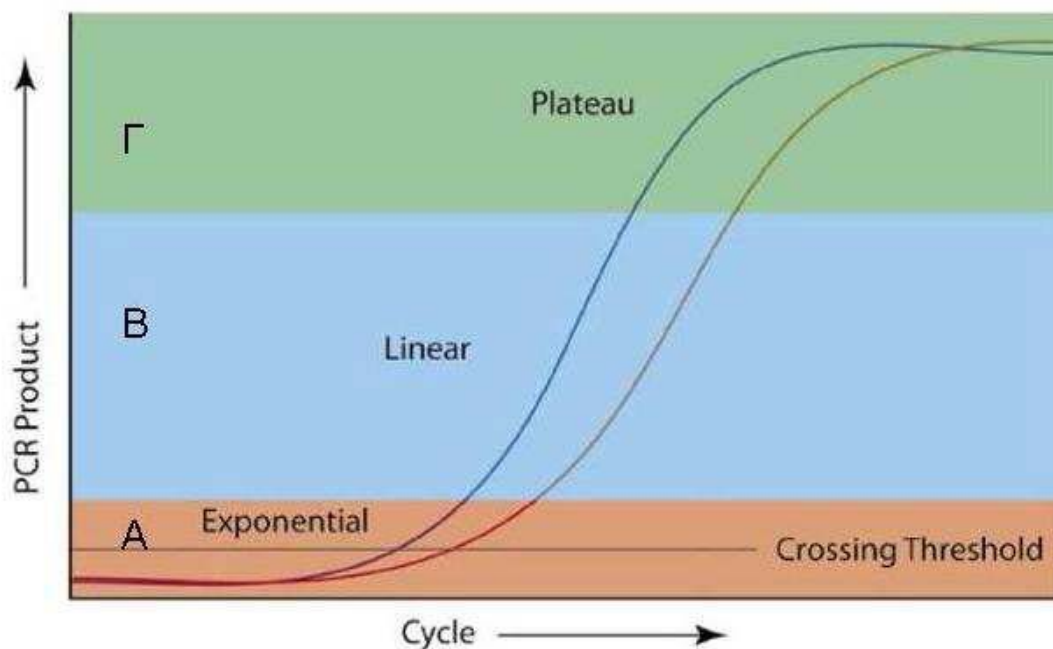
Εικόνα 4: Τα στάδια της PCR και τρόπος λειτουργίας της μεθόδου

Τα τρία παραπάνω στάδια αντιπροσωπεύουν ένα κύκλο PCR, ο οποίος ολοκληρώνεται σε 2-3 λεπτά περίπου, αν και αυτό εξαρτάται από το πόσο γρήγορα ο θερμοκυκλοποιητής επιτυγχάνει τις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας στα προαναφερθέντα τρία στάδια αντιγραφής. Μετά το τέλος του 1ου κύκλου η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95 °C και ξεκινά ο 2ος κύκλος αντιγραφής. Συνήθως εκτελούνται 25-30 κύκλοι PCR. (Παπαναστασοπούλου Μ., 1997) Ωστόσο, ο συνολικός αριθμός των κύκλων αντιγραφής εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μορίων του DNA προτύπου. Σε κάθε κύκλο αντιγραφής, ως μήτρες χρησιμοποιούνται τόσο οι αρχικές όσο και οι καινούργιες DNA αλυσίδες που συνθέτουν στους αμέσως προηγούμενους κύκλους. Επομένως, μετά το τέλος κάθε κύκλου η προϋπάρχουσα ποσότητα του DNA-προτύπου διπλασιάζεται. Εάν, λοιπόν, ο αριθμός των κύκλων είναι n , τότε η ποσότητα του DNA που αντιγράφεται αυξάνεται σε 2^n . Όταν η απόδοση του συστήματος είναι 100% η ποσότητα του προτύπου, μετά από 25-30 κύκλους, θα αυξηθεί κατά 33,6 εκατομμύρια έως 1 δισεκατομμύριο φορές περίπου, αντίστοιχα, μέσα σε 3 ώρες. Στην πραγματικότητα όμως, λόγω της προοδευτικής μείωσης

της δραστηριότητας του ενζύμου και λόγω διάφορων άλλων παραγόντων, η απόδοση του συστήματος είναι πάντοτε μικρότερη. Έτσι, για παράδειγμα, όταν η απόδοση είναι 80%, που θεωρείται ως μια σχετικά καλή απόδοση, τότε η ποσότητα του προτύπου, μετά από 30 κύκλους, αυξάνεται κατά 45,5 εκατομμύρια φορές. (Mullis KB, 1987)

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

1. Εκθετική (exponential) φάση: Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA
2. Γραμμική (linear) φάση: Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων
3. Φάση Plateau: Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση της PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Applied Biosystems, XX)



Εικόνα 5: Η καμπύλη παρουσιάζει τις τρεις φάσεις στις οποίες χωρίζεται η διαδικασία της PCR. Α) Εκθετική φάση (Exponential phase), Β) Γραμμική φάση (Linear phase) και Γ) Φάση Πλατώ (Plateau) (VanGuilder et al, 2008).

7.3 ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ PCR

Παραλλαγές της PCR αποτελούν η RNA-RT-PCR (reverse transcription-PCR), η διπλή PCR (nested PCR- double PCR with nested primers), η αντίστροφη (inverse) PCR, η in situ PCR, η TouchdownPCR, ηθερμής έναρξης (Hotstart)PCR, η LongPCR, η ανταγωνιστική PCR (competitive PCR, cPCR)κ.ό.κ. Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τη βασική μεθοδολογία της PCR, τις παραλλαγές της και τις παραμέτρους που επηρεάζουν την ειδικότητα της και την απόδοσή της σε προϊόν αναφέρονται σε διάφορα εγχειρίδια, στα οποία μπορεί κανείς ακόμη να βρει βασικές εφαρμογές της μεθόδου στη γενετική, στην ιατρική, στην ιατροδικαστική και σε διάφορα άλλα πεδία έρευνας.

7.4 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR

Τρωτό σημείο της μεθόδου είναι η μεγάλη ευαισθησία της, με συνέπεια την πιθανή λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Αιτία των αποτελεσμάτων αυτών είναι η τυχαία μεταφορά απειροελάχιστης ποσότητας εξωγενούς νουκλεϊκού οξέος από ένα δείγμα σε άλλο με τα εργαλεία, τον αέρα ή τα αντιδραστήρια. Το εξωγενές νουκλεϊκό οξύ μπορεί να προέρχεται ακόμη και από το δέρμα των χεριών του εκτελεστή της μεθόδου. Το νουκλεϊκό αυτό οξύ μπορεί να χρησιμεύει ως μήτρα κατά την αντιγραφή, αντί του επιθυμητού προτύπου. Η σωστή προετοιμασία του δείγματος αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την αξιοπιστία της εξέτασης. Οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψιν είναι επιγραμματικά : το δείγμα και τα χαρακτηριστικά του (προέλευση, όγκος, φυσικοί χαρακτήρες, παρουσία αναστολέων κλπ), τα χαρακτηριστικά του νουκλεϊκού οξέος-στόχου (DNA- RNA στόχος, διπλής ή μονής έλικας) κ.ό.κ. Μεγάλη ποσότητα νουκλεϊκών οξέων μπορεί να αναστείλει την αντίδραση για αυτό απαιτείται μία τουλάχιστον υποδεκαπλάσια αραιώση δείγματος. Αντιθέτως, καταστροφή με ενζυματικό ή χημικό τρόπο ενός αριθμού νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα μπορούν να μειώσουν την ευαισθησία της μεθόδου. Τέλος, ως αναστολείς της μεθόδου δρουν εξίσου οι παράγοντες : παρουσία ενώσεων δισθενούς μαγνησίου, διάσπαση της αλληλουχίας- στόχου ή των εκκινητών και άμεση αναστολή της DNA πολυμεράσης. Ο Rossen και οι συνεργάτες του (1992)

διερεύνησαν την επίδραση διαφορετικών ομογενοποιημένων τροφίμων σε σχέση με τα αποτελέσματά της και έδειξαν ότι ο βαθμός αναστολής της PCR εξαρτάται από το είδος του τροφίμου. (Rossen et al., 1992)

7.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΤΗΣ PCR

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Για να γίνει ορατό το προϊόν της αντίδρασης και να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα του, δηλαδή να διαπιστωθεί αν περιέχονται σε αυτό οι αναμενόμενες αλληλουχίες βάσεων του DNA-προτύπου, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι. Εν προκειμένω, πραγματοποιήθηκε **ηλεκτροφόρηση** (ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων συνήθως πρωτεϊνικής ή νουκλεϊκής φύσεως από ένα μίγμα) του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης και στη συνέχεια χρώση του με τη φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο 3,8-διαμινο-5-αιθυλ-6-φαινυλφαινανθριδίνιο (ethidium bromide). Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται το μέγεθος του προϊόντος, το οποίο πρέπει να είναι ίδιο με εκείνο του DNA-προτύπου. Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο (πηκτή) που πάνω του έχει τοποθετηθεί (ή/και ενσωματωθεί) σε ένα σημείο το προς ανάλυση δείγμα. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος τους. Έτσι τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται περισσότερο από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερο φορτισμένα λιγότερο, οπότε επέρχεται διαχωρισμός. Το μέγεθος των τμημάτων καθορίζεται ύστερα από σύγκρισή τους με διάλυμα που περιέχει τμήματα DNA γνωστών μεγεθών. Το διάλυμα αυτό, το οποίο είναι βαθμολογητής μοριακού βάρους και ονομάζεται κλίμακα DNA (DNA ladder ή molecular weight marker), ακολουθεί την ίδια πορεία ηλεκτροφόρησης, με τα προϊόντα της PCR, για τη δυνατότητα σύγκρισής τους. (Σαδίκογλου Ε., BIOMED CBC)

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Θάλαμος ηλεκτροφόρησης και τροφοδοτικό συσκευής
- Δίσκος πηκτώματος

- Χτένα δειγμάτων
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-acetic acid-EDTA (TAE) ή Tris-borate-EDTA (TBE)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης
- Βρωμιούχο εθίδιο
- Τράπεζα λάμπας υπεριώδους



Εικόνα 6: Εξοπλισμός που απαιτείται για την ηλεκτροφόρηση

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

Το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τον διαχωρισμό των νουκλεϊκών οξέων. Τα τελευταία 30 χρόνια είναι η μέθοδος επιλογής για την ανάλυση του DNA. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που απαντάται σε φύκια. Διαλυτοποιείται στο νερό σε υψηλές θερμοκρασίες και σχηματίζει, καθώς ψύχεται, πήκτωμα. Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα καθορίζεται κυρίως από το μέγεθος του DNA που θα αναλυθεί. Χαμηλές συγκεντρώσεις (0.4% - 1.2% w/v) χρησιμοποιούνται στον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (μέχρι 2.5 % w/v) στην ανάλυση μορίων μικρού μεγέθους, ενώ υπάρχουν ειδικοί τύποι αγαρόζης για ειδικές εφαρμογές (όπως αγαρόζη χαμηλής τήξης). Η αγαρόζη που χρησιμοποιείται είναι υψηλής

καθαρότητας (κατάλληλη για τεχνικές μοριακής βιολογίας), διότι οι προσμίξεις(πολυσακχαρίτες, άλατα, πρωτεΐνες) επηρεάζουν την διαχωριστική ικανότητα.

Για τη δημιουργία πηκτώματος αραρόζης, αναμιγνύεται σκόνη αραρόζης με το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (TBE) σε επιθυμητή συγκέντρωση, περίπου 0,8% έως 4%. Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί εντελώς και προστίθεται βρωμιούχο εθίδιο τελικής συγκέντρωσης 0,5μg/ml. Όταν το διάλυμα φτάσει τους 60 °C αποχύνεται στο δίσκο πηκτώματος, στον οποίο έχουν τοποθετηθεί οι κτένες δειγμάτων. Το υγρό πήκτωμα αφήνεται στο δίσκο σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί ή τοποθετείται σε ψυγείο για πιο γρήγορη ψύξη. Τέλος, απομακρύνονται με μεγάλη προσοχή οι κτένες δειγμάτων, με αποτέλεσμα να προκύπτουν πηγάδια για πλήρωση με τα δείγματα.

ΦΟΡΤΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Το πήκτωμα μαζί με το δίσκο, τοποθετούνται οριζόντια στο θάλαμο ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια γεμίζεται ο θάλαμος με ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα. Τα δείγματα DNA, αναμειγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και με τη βοήθεια πιπέτας, αποχύνονται στα πηγάδια δειγμάτων. Ακολουθεί κλείσιμο της συσκευής και σύνδεσή της με ρεύμα. Οι φυσαλίδες είναι ενδεικτικές της ροής του ρεύματος και το DNA μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο, το οποίο συνήθως είναι κόκκινου χρώματος.



Εικόνα 7: Τοποθέτηση δειγμάτων DNA

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA

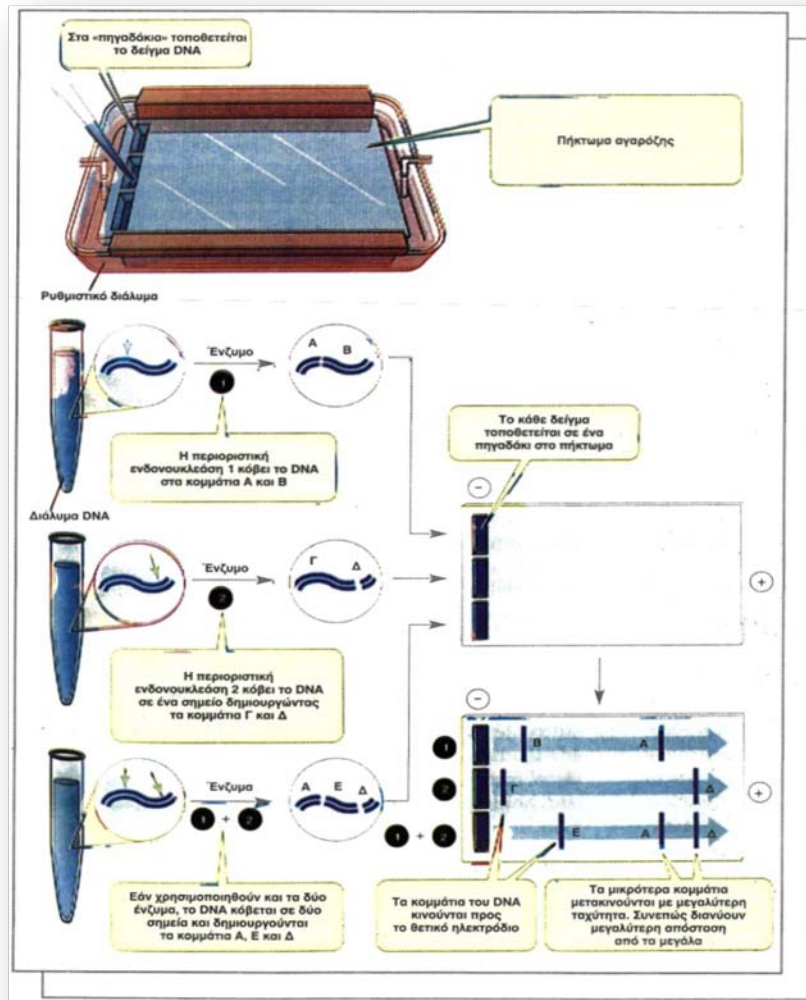
Το DNA καθίσταται συνήθως ορατό με την προσθήκη στο δείγμα και στο πήκτωμα βρωμιούχου εθιδίου το οποίο ενσωματώνεται και μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία φθορίζει. Το όριο ανίχνευσης είναι ~20 ng DNA. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες να αντικατασταθεί το βρωμιούχοεθιδιοκαθώς είναι μεταλλαξογόνο και η χρήση του προϋποθέτει πρωτόκολλα ασφαλούς απομάκρυνσης. Για την οπτικοποίηση των τμημάτων του DNA στο πήκτωμα, το τελευταίο, τοποθετείται σε τράπεζα λάμπας υπεριώδους στα 320nm. Το νουκλεϊκό οξύ διαχέεται γρήγορα στο πήκτωμα και έτσι η παρατήρησή του ή η φωτομέτρηση πρέπει να πραγματοποιηθεί σύντομα μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA

Τα γραμμικά τμήματα DNA μετακινούνται μέσα στην αгарόζη με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του \log_{10} του μοριακού τους βάρους. Αν αναπαρασταθεί γραφικά η απόσταση που διένυσαν τα τμήματα του DNA (από το πηγάδι έως το τελικό σημείο μετά την ηλεκτροφόρηση) προς το δεκαδικό λογάριθμο του μοριακού βάρους τους ή του πλήθους του ζεύγους των βάσεων τους, θα σχηματιστεί σχεδόν μια ευθεία γραμμή. Η κυκλική μορφή DNA μετακινείται διαφορετικά από το γραμμικό μόριο DNA μέσα στην αгарόζη. Ατεμάχιστα πλασμίδια μετακινούνται πιο γρήγορα από τα ίδια πλασμίδια γραμμικής μορφής. (Chankvetadze et al 2000)

Οι παράγοντες που έχουν σημαντική επίδραση στην κινητικότητα των τμημάτων DNA και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση του διαχωρισμού των θραυσμάτων του, είναι οι εξής :

- Φορτίο και μέγεθος των προς διαχωρισμό τμημάτων
- Συγκέντρωση αгарόζης
- Τάση ρεύματος
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TBE)
- Επίδραση βρωμιούχου εθιδίου



Εικόνα 8: Η διαδικασία και τα στάδια ηλεκτροφόρησης (στη συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται χρήση ενζύμων)



Εικόνα 9: Η τελική εικόνα του πηκτώματος με τα φωτωμένα δείγματα DNA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

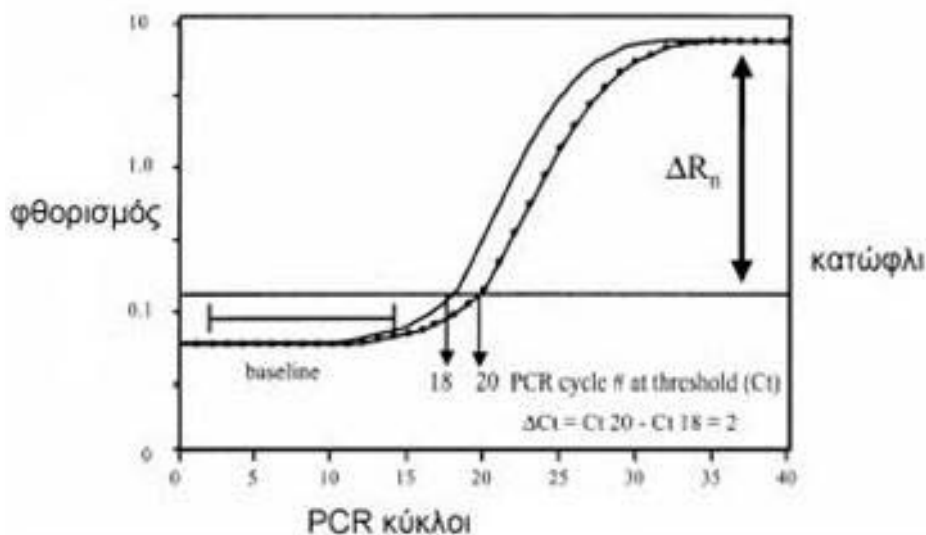
REAL TIME PCR

Η μέθοδος της Real Time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου, η οποία μπορεί να ενισχύσει, να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μια αλληλουχία-στόχο με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αποτέλεσε η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο της βρίσκεται η αντίδραση. Η λειτουργία της τεχνολογίας Real Time PCR βασίζεται στην χρήση μηχανισμών ανίχνευσης, με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών που διεγείρονται και εκπέμπουν συγκεκριμένου μήκους κύματος φώς, (λ), όπως η SYBR green καθώς και ιχνηλατών (probes) αλλά και στις ειδικά διαμορφωμένες συσκευές Real Time PCR που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της. Οι συσκευές της Real Time PCR βασίζονται τόσο στο σύστημα ανίχνευσης που διαθέτουν, για την ανίχνευση του σήματος που εκπέμπει ο εκάστοτε μηχανισμός ανίχνευσης, όσο και στο ειδικό λογισμικό με το οποίο αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την διάρκεια της αντίδρασης.

8.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η Real Time PCR ή PCR στον πραγματικό χρόνο είναι μία ποσοτική αντίδραση PCR κατά την οποία η μεγέθυνση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη Real Time PCR. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: α) την εκθετική, β) τη γραμμική και γ) τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ.

dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (Bustin et al., 2005, Kubista et al., 2006).

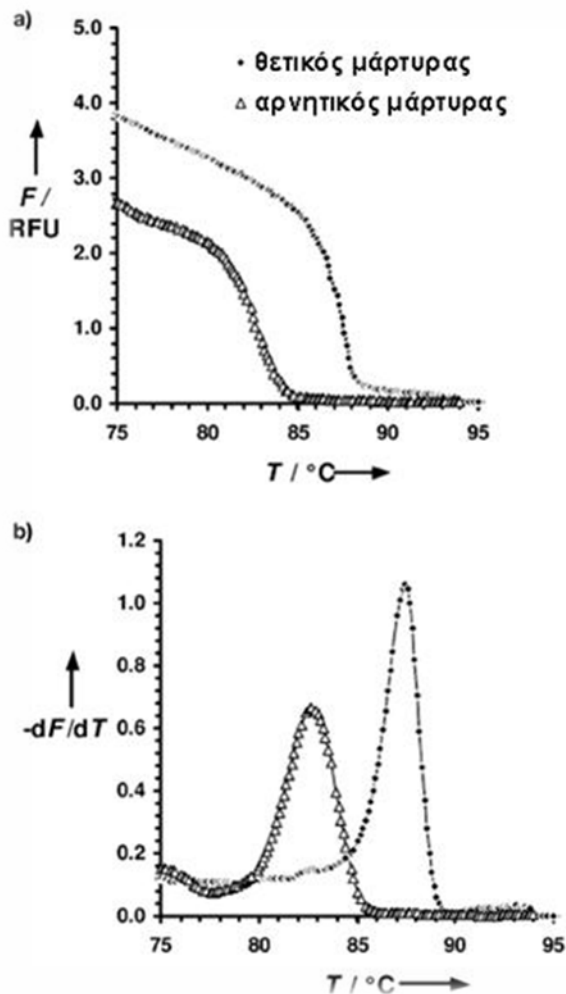


Εικόνα 10: Υποθετική γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού σε πειράματα RealTime PCR.

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Ως baseline ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα

συσσωρεύεται μεν αλλά είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης από το μηχάνημα. Αυτό το σήμα χρησιμοποιείται για τη χάραξη του κατωφλιού. Το κατώφλι υπολογίζεται επί 10 φορές της κανονικής παρέκκλισης από το μέσο σήμα της χρωστικής της baseline.

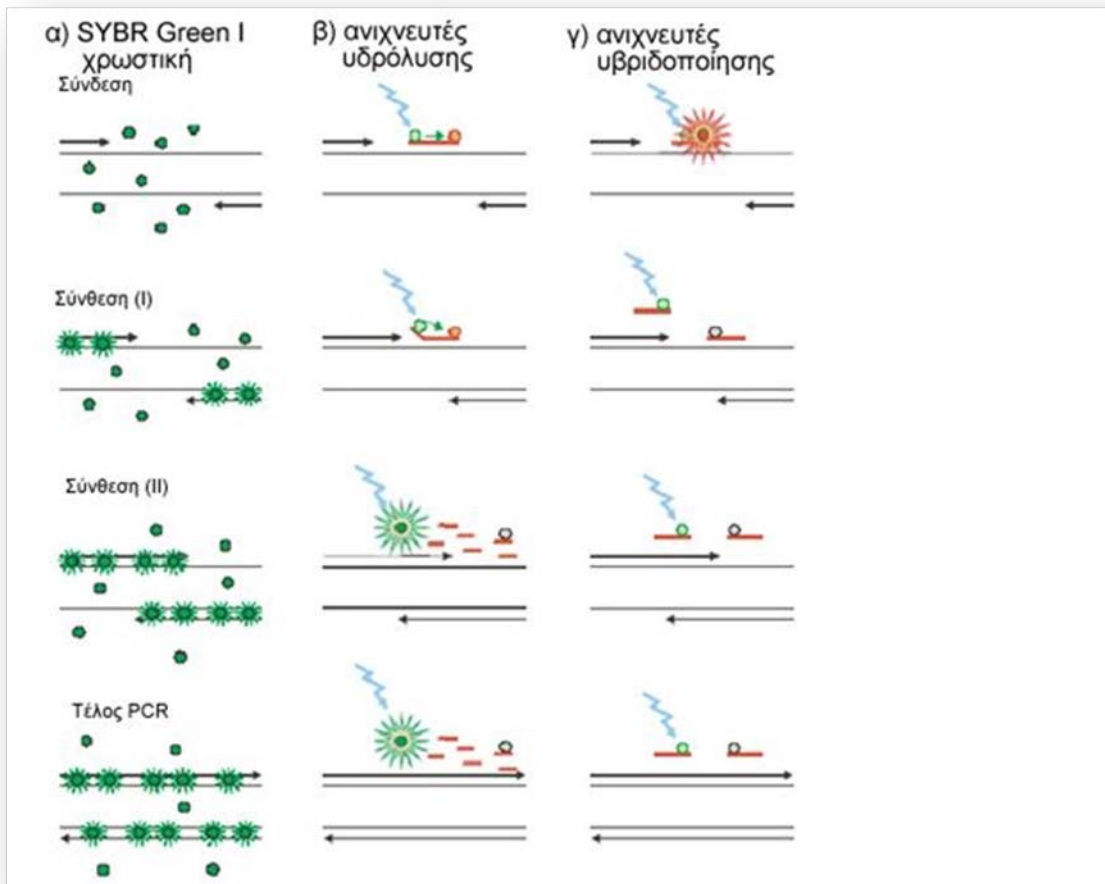
Με τη RealTime PCR, εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis), κατά την οποία οι μεγεθυμένες αλληλουχίες μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση το σημείο τήξης τους (T_m), το οποίο είναι συνάρτηση του μήκους και της σύνθεσης των βάσεων του προϊόντος. Το σημείο τήξης είναι μοναδικό για κάθε αλληλουχία και χαρακτηριστικό για αυτήν.



Εικόνα 11: Αποτελέσματα ανάλυσης της καμπύλης τήξης ενός θετικού και ενός αρνητικού μάρτυρα. Ο θετικός μάρτυρας περιέχει το ειδικό PCR προϊόν με $T_m = 87.5$ °C, ενώ ο αρνητικός περιέχει εκκινητές και διμερή αφετηριών (primers dimmers) χαμηλότερο $T_m = 83$ °C. **a) Δεδομένα της καμπύλης τήξης.** Η αρχική μικρή πτώση οφείλεται στη θερμοκρασία την εξαρτώμενη από το χρωμογόνο, ενώ η επόμενη απότομη πτώση αναπαριστά την διαδικασία τήξης του προϊόντος. **b) Αναπαράσταση της κορυφής της τήξης από τα δεδομένα της καμπύλης της (a).**(Wilhelm J, Pingoud A. Real –Time Polymerase Chain Reaction. ChemBioChem 2003, 4, 1120-1128.)

8.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ REAL TIME PCR

Υπάρχουν δύο είδη χημειών για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας του DNA, με Real Time PCR: τα μη ειδικά και τα ειδικά συστήματα. Στην πρώτη περίπτωση ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια DNA, τα οποία ενισχύονται κατά την αντίδραση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση επιτυγχάνεται διαχωρισμός της ενισχυόμενης αλληλουχίας-ενδιαφέροντος από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών (Bustin, 2000; Giulietti et al., 2001) (Eurogentec 2004). Σε γενικές γραμμές, χρησιμοποιούνται σημασμένοι ανιχνευτές διαφόρων τύπων, όπου ο καθένας έχει μοναδικά χαρακτηριστικά, αλλά η στρατηγική είναι απλή για όλους, δηλαδή πρέπει να προκαλέσουν μια αλλαγή κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Σήμερα οι πιο κοινές μέθοδοι χημείας που χρησιμοποιούνται στη RealTimePCR είναι: α) η SYBRgreenI χρωστική, β) οι ανιχνευτές υδρόλυσης (Hydrolysisprobes) και γ) οι ανιχνευτές υβριδοποίησης (Hybridizationprobes) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Μέθοδοι Real Time PCR. α) SYBR green I χρωστική, β) ανιχνευτές υδρόλυσης και γ) ανιχνευτές υβριδοποίησης (van der Velden VH, et al. *Leukemia*.2003, 17(6):1013-34)

Μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης

Συνήθως στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία ενσωματώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA). Μια τέτοια ουσία ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR green I. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου. Επομένως η ένταση του σήματος σε κάθε βήμα της αντίδρασης PCR αυξάνει καθώς αυξάνει και η συγκέντρωση του προϊόντος. Το γεγονός αυτό παρέχει μία απλή και αξιόπιστη μέθοδο

ελέγχου της RealTime PCR. Ακόμη ένα πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση μη τροποποιημένων αφετηριών, η οποία διευκολύνει τον σχεδιασμό και την σύνθεση των αφετηριών με χαμηλό κόστος σε σχέση με τις άλλες μεθόδους RealTime PCR. Επιπλέον η SYBR green I επιτρέπει και ποιοτική ανάλυση, με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος, δεδομένου ότι κάθε προϊόν ανάλογα με το μέγεθος του έχει μια χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης (T_m). Η θερμοκρασία τήξης (T_m) μπορεί να χρησιμοποιηθεί επομένως ως διαγνωστικό στοιχείο, όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, εφόσον η αναπαραγωγή του πειράματος γίνεται κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες, αφού οι τιμές της θερμοκρασίας τήξης (T_m) επηρεάζονται από: τη συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου, του DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο), του δείγματος του DNA, της SYBR green I και το ρυθμό διακύμανσης της θερμοκρασίας κατά την ανάλυση της καμπύλης τήξης.

Το κύριο μειονέκτημα της χρωστικής SYBR green I είναι ότι συνδέεται και στα μη ειδικά προϊόντα, οπότε πρέπει να γίνεται σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των ειδικών και μη ειδικών προϊόντων, όταν χρησιμοποιούμε ανάλυση της καμπύλης τήξης. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Παρ'όλα αυτά υπάρχει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί. Ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών.

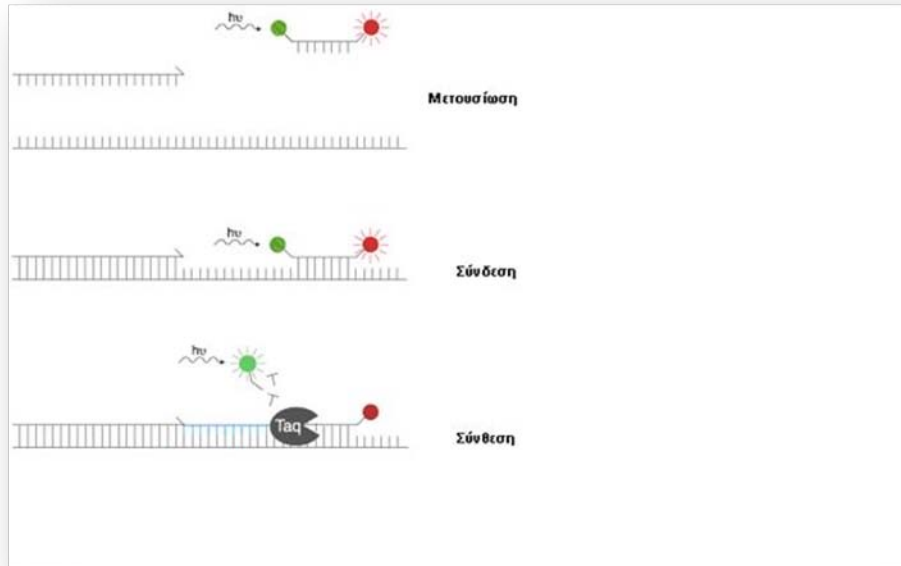
Ειδικά συστήματα ανίχνευσης

Μεγαλύτερη ειδικότητα στη Real Time PCR επιτυγχάνεται με την χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ανιχνευτών (oligoprobes), οι οποίοι είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο απόσβεσης (quencher), και υβριδίζονται στο πρότυπο DNA. Μέθοδοι ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών είναι οι :

- Taqman probes (εικόνα 13),
- Molecular beacons (εικόνα 14)
- Scorpion primers (εικόνα 15)

Taqman probes

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, γίνεται χρήση τριών ολιγονουκλεοτιδίων: δύο εκκινητών και ενός ανιχνευτή που αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά σε εσωτερική αλληλουχία του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος της PCR. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δράση 5'-νουκλεάσης της DNA πολυμεράσης, η οποία χρησιμοποιείται για την υδρόλυση του ανιχνευτή και κατ' επέκταση την απελευθέρωση της φθορίζουσας χρωστικής που βρίσκεται στο 5' άκρο. Ο Taqman ανιχνευτής σχεδιάζεται για να υβριδίζεται στο πρότυπο DNA μεταξύ των αφετηριών και όταν είναι υβριδισμένος δεν φθορίζει, διότι τα δύο μόρια στα άκρα του, δότης στο 5' άκρο και μόριο απόσβεσης στο 3' άκρο, βρίσκονται κοντά. Αντίθετα, όταν το μόριο δότης απομακρυνθεί κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR από το μόριο απόσβεσης, φθορίζει έντονα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, ο οποίος αυξάνεται ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος κατά την αντίδραση ενίσχυσης.

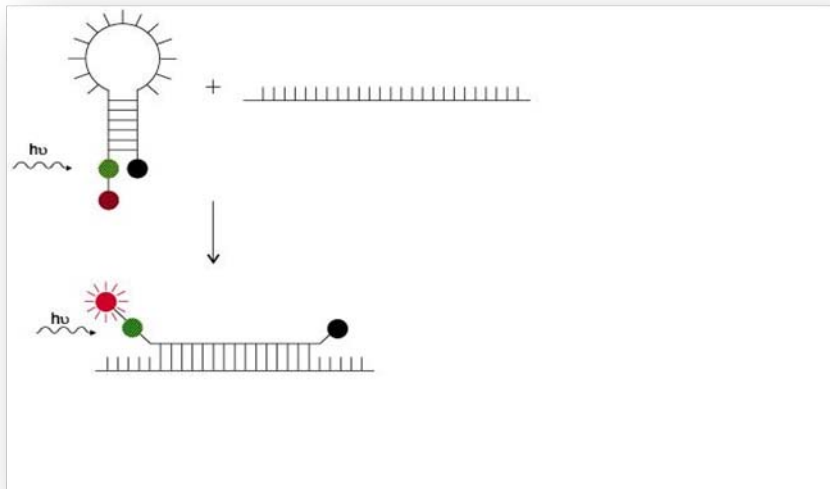


Εικόνα 13: Σχηματική παράσταση Real Time PCR με TaqMan εκκινητές

Molecular beacons

Όταν το ολιγονουκλεοτίδιο βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα σχηματίζει μια δομή, η οποία αποτελείται από ένα δίκλωνο μίσχο και μία μονόκλωνη θηλιά. Η δομή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα δύο μόρια χρωστικής, που βρίσκονται στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου, να έρχονται πολύ κοντά το ένα στο άλλο, κάτι που αποτρέπει την παραγωγή φθορισμού λόγω του φαινομένου FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Η πρόσδεση του ολιγονουκλεοτιδίου στο προϊόν της αντίδρασης συμβάλλει στην απομάκρυνση των δύο χρωστικών, στην αδυναμία εκδήλωσης του φαινομένου FRET και κατά συνέπεια στην παραγωγή φθορισμού.

Οι Molecular beacons ανιχνευτές είναι πολύ πιο ειδικοί από τους συμβατικούς ανιχνευτές ίδιου μήκους. Επιπλέον, παρουσιάζουν ευρεία εφαρμογή κυρίως στον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων και πολυμορφισμών, στην ποσοτικοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς επίσης και στον προσδιορισμό του φύλου των εμβρύων.

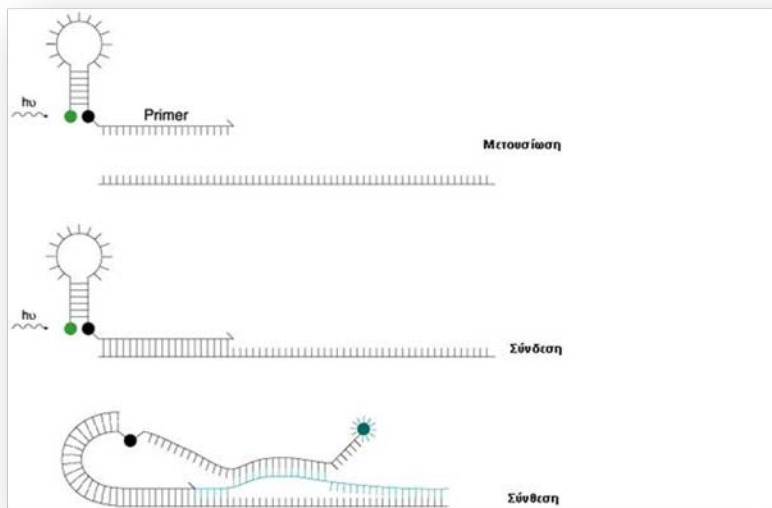


Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση Real Time PCR με molecular beacons

Scorpions

Μετά τη φάση επιμήκυνσης της αντίδρασης, ο ανιχνευτής υβριδοποιείται, μέσω της θηλιάς, στον ίδιο κλώνο του προϊόντος που επιμήκυνε. Η υβριδοποίηση αυτή συνεπάγεται την απομάκρυνση των δύο χρωστικών και την παραγωγή φθορισμού.

Οι εκκινητές Scorpions χρησιμοποιούνται όπως και οι Molecular Beacon για την ανίχνευση μεταλλάξεων, καθώς και σε μελέτες ποσοτικοποίησης. Παρουσιάζουν, όμως, επιπλέον πλεονεκτήματα λόγω του γρηγορότερου μηχανισμού αντίδρασής τους και της εμφάνισης χαμηλότερου μη ειδικού σήματος (background).



Εικόνα 15: Σχηματική παράσταση Real Time PCR με Scorpion εκκινητές

8.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

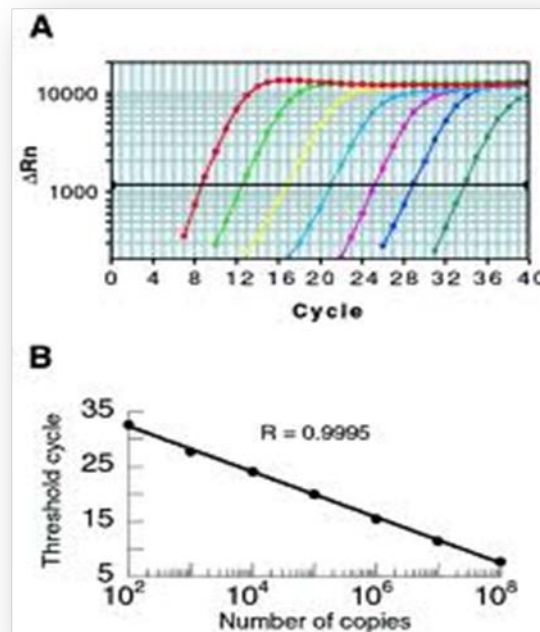
Υπάρχουν δύο μέθοδοι ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων της PCR: η απόλυτη και η σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης.

Απόλυτη ποσοτικοποίηση

Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται μια πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με βάση διαδοχικές αραιώσεις δείγματος DNA γνωστής συγκέντρωσης στις ίδιες συνθήκες της RealTimePCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα. Στη συνέχεια,

λαμβάνοντας υπόψιν το μοριακό βάρος του χρησιμοποιούμενου DNA, η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος μετατρέπεται σε αριθμό αντιγράφων. Η γραμμή Threshold είναι το σημείο στο οποίο το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real Time PCR ξεχωρίζει έντονα από το φόντο, ενώ ο κύκλος κατά τη διάρκεια του οποίου, το δείγμα φτάσει στην γραμμή Threshold ονομάζεται Threshold cycle (Ct). (AppliedBiosystems, XX) Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct για κάθε δείγμα, δηλαδή αναλογικά η Ct θα είναι μικρότερη. (Wong et al, 2005)

Μετά το τέλος της αντίδρασης η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται ως μια ευθεία γραμμή και πρέπει να βασίζεται τουλάχιστον σε 4 σημεία (γνωστής συγκέντρωσης) και τα σημεία αυτά να καλύπτουν το εύρος συγκεντρώσεων των υπό μελετη δειγμάτων. Σε αντίθετη περίπτωση η ποσοτικοποίηση ενδέχεται να μην είναι αξιόπιστη.



Εικόνα 16: a) Οριοθέτηση του σημείου threshold (ευκολότερος προσδιορισμός Ct) και b) Καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αγνώστων δειγμάτων.

Ένα σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης εξωτερικών δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης, για την ποσοτικοποίηση αγνώστων δειγμάτων, αποτελεί η αδυναμία εντοπισμού και

διόρθωσης πιθανών αναστολέων που επηρεάζουν την πορεία της αντίδρασης. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί χρησιμοποιώντας κάποιο εσωτερικό δείγμα ελέγχου (control), όπως για παράδειγμα ένα συνθετικό νουκλεϊνικό τμήμα που πολλαπλασιάζεται σε παράλληλη αντίδραση με τα δείγματα προς ανάλυση (Eurogentec 2004) .

Σχετική ποσοτικοποίηση

Είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη ποσοτικοποίηση και για τη μέθοδο αυτή δεν είναι απαραίτητη η χρήση καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπο μελέτη γονιδίου μετά από αλυσιδωτή ενίσχυση με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος ή σε διαφορές στην αποδοτικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουμε την έκφραση του υπο μελέτη γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

Η Real Time PCR μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε παραδοσιακές όσο και σε νέες εφαρμογές, με πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την απλή PCR (Καπαρός Γ.,2012). Το γεγονός ότι η μέθοδος συλλέγει στοιχεία κατά την εκθετική φάση πολλαπλασιασμού του DNA, ανοίγει νέες προοπτικές για νέες εφαρμογές :

- Ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών (π.χ. ιοί)
- Μέτρηση της έκφρασης κάποιων γονιδίων
- Επαλήθευση πολλαπλασιασμού κάποιων γονιδίων (gene amplification)
- Αποτελεσματικότητα θεραπευτικής αγωγής (π.χ. νέα φάρμακα για τον καρκίνο)
- Ποσοτικό προσδιορισμό βλάβης στο DNA
- Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών
- Προσδιορισμό γονότυπου (genotyping)

8.4 ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ PCR ΚΑΙ REAL TIME PCR

Τα πλεονεκτήματα της RealTime PCR, έναντι της απλής PCR, αλλά και άλλων μοριακών μεθόδων, είναι πολλά. Το πιο σημαντικό ίσως αναφέρεται στην ικανότητα υπολογισμού νουκλεϊκών οξέων με απίστευτο πλατύ δυναμικό εύρος (το λιγότερο 5 λογαριθμικές μονάδες). Η ικανότητα αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα μεγάλη ευαισθησία που έχει η μέθοδος, στην οποία οφείλεται η ανίχνευση αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών λιγότερων από πέντε (ίσως και μόνο ενός σε μερικές περιπτώσεις). Επιπλέον πλεονεκτήματα είναι ο μικρότερος χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα κλειστό υψηλής τεχνολογίας σύστημα ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR για την ανάλυση του προϊόντος και να ελαχιστοποιούνται έτσι οι επιμολύνσεις στο εργαστήριο και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Ορισμένες εντοπισμένες διαφορές παραθέτονται παρακάτω :

- Τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR μπορούν να ελεγχθούν μόνο μετά το τέλος της διαδικασίας και αφού πρώτα γίνει ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων. Αντίθετα η Real Time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας των προϊόντων, οποιαδήποτε στιγμή, μέσω κάμερας που διαθέτει η συσκευή Real Time PCR, επισπεύδοντας έτσι την διαδικασία. Η κάμερα αυτή καταγράφει τον φθορισμό που εκπέμπουν τα προϊόντα που σχηματίζονται και στη συνέχεια δίδει τα δεδομένα στον υπολογιστή με τον οποίο συνδέεται η συσκευή.
- Η ανίχνευση των προϊόντων στην PCR, γίνεται στην φάση του plateau, δηλαδή προς το τέλος της διαδικασίας και έχει αρχίσει να μειώνεται ο ρυθμός δημιουργίας αντιγράφων, λόγω ελάττωσης αντιδραστηρίων και μειωμένης δραστηριότητας της Taq πολυμεράσης. Αντίθετα στην Real Time PCR τα προϊόντα ανιχνεύονται κατά τη διάρκεια της εκθετικής (exponential) φάσης, όπου τα αποτελέσματα είναι πιο ακριβή.
- Ακόμα, στο διάλυμα της Real Time PCR προστίθεται χρωστική ουσία (SYBRgreen ή probes) που αποτελεί μηχανισμό ανίχνευσης για την παρακολούθηση της αντίδρασης μέσω κατάλληλου ανιχνευτή της ακτινοβολίας της

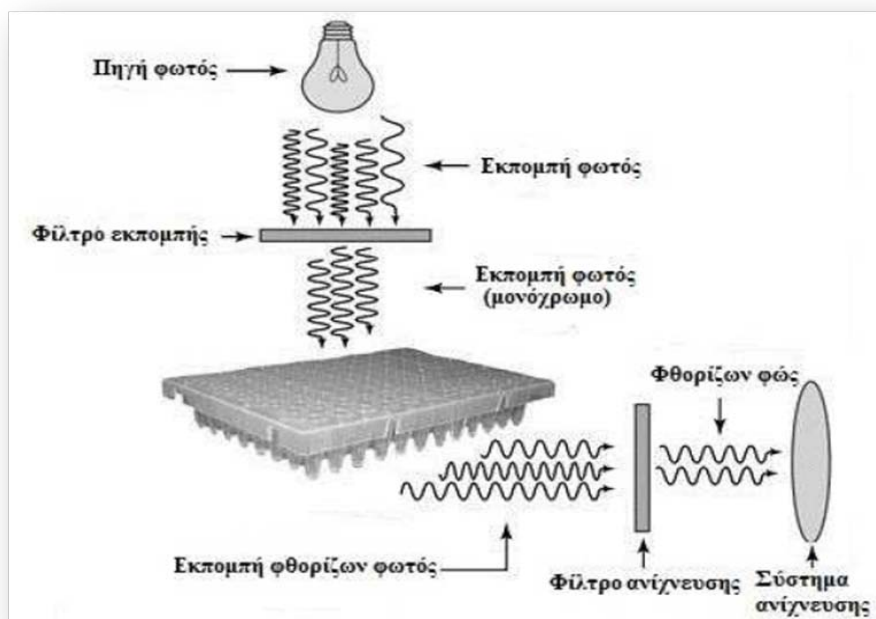
χρωστικής, ενώ στην PCR η ανίχνευση γίνεται με την προσθήκη Ethidiumbromide στην πηκτική αγαρόζης, μετά τη ολοκλήρωση της αντίδρασης (Hunt, 2006).

- Τέλος, με την Real Time PCR είναι δυνατό να αξιολογήσουμε αν τα προϊόντα της αντίδρασης προέρχονται όντως από το τμήμα DNA που χρησιμοποιείται ως στόχος, ενώ στην PCR δεν υπάρχει αυτή η δυνατότητα (Houghton et al, 2006).

8.5 ΣΥΣΚΕΥΗ REAL TIME PCR - ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΟΥ

Όλες οι συσκευές της Real Time PCR συνδυάζουν την τεχνολογία της συμβατικής PCR για την παραγωγή και πολλαπλασιασμό προϊόντων με συστήματα για παραγωγή, ανίχνευση και ανάλυση του φθορίζον σήματος που παράγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Υπάρχουν πολλές εταιρείες που διαθέτουν συσκευές Real Time PCR και το κόστος της κάθε μίας διαφέρει ανάλογα με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (Fraga et al., 2008).

Η μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στις διάφορες συσκευές είναι το λογισμικό που διαθέτει η κάθε μία για την ανάλυση των δεδομένων και το σύστημα ανίχνευσης της χρησιμοποιούμενης χρωστικής φθορισμού.



Εικόνα 17: Διάγραμμα με τον βασικό τρόπο λειτουργίας όλων των συσκευών Real Time PCR γενικά.

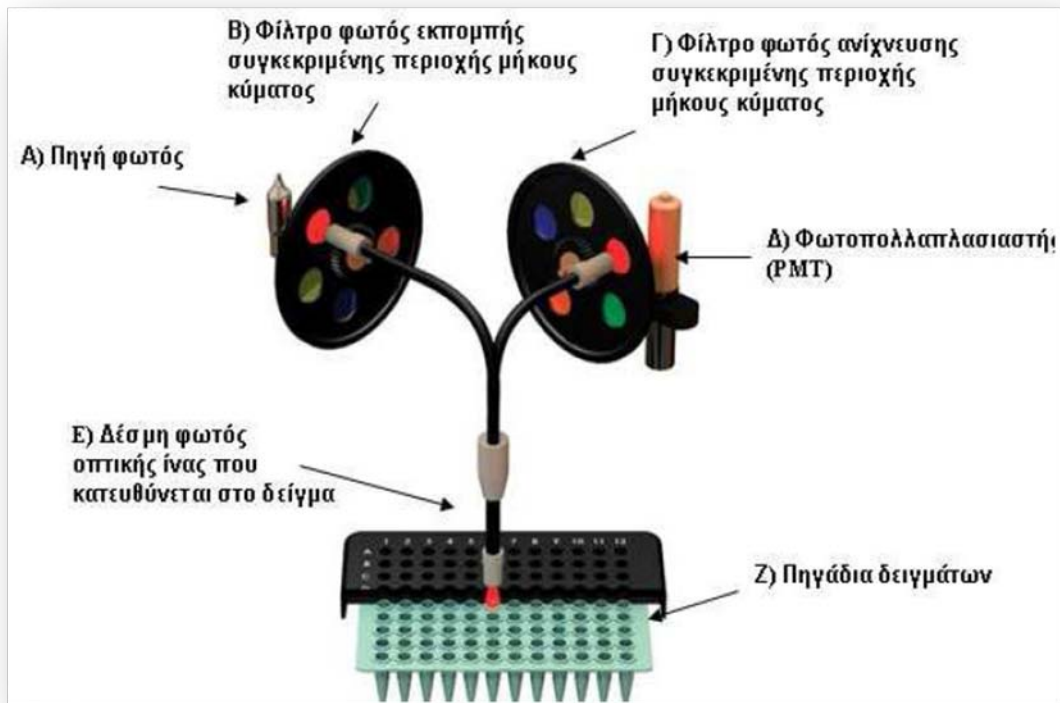


Εικόνα 18: Η συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International (www.appliedbiosystems.com)

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή του πειράματος της παρούσας πτυχιακής εργασίας που θα αναφερθεί στην ενότητα του πειραματικού μέρους και το οποίο περιγράφεται είναι το μοντέλο StepOne Plus Real Time PCR.

Η συσκευή αυτή έχει τη δυνατότητα διεξαγωγής αντίδρασης Real Time PCR, ολοκλήρωσης της αντίδρασης σε 40 κύκλους και διαχωρισμό δειγμάτων με 5000 και 10000 αντίγραφα της αλληλουχίας με ποσοστό βεβαιότητας 99,7%. Το οπτικό σύστημα του StepOne Plus Real Time PCR αποτελείται από την πηγή φωτός (λάμπα), τα φίλτρα και την κεφαλή ανίχνευσης. Η συσκευή είναι συνδεδεμένη με έναν υπολογιστή που συλλέγει και αναλύει τα δεδομένα της αντίδρασης. Τα διάφορα μέρη του οργάνου είναι :

- Πηγή φωτός
- Είδη φίλτρων, αριθμός και ποιότητα φωτός
- Ανίχνευση και συστήματα ανίχνευσης
- Πηγάδια δειγμάτων
- Λογισμικό
- Είδη Ανάλυσης



Εικόνα 19: Αναλυτική περιγραφή των τμημάτων που αποτελούν την συσκευή StepOne Plus Real Time PCR της εταιρείας Applied Biosystems International

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΡΒΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΜΕ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

9.1 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

Οι νέες νομοθεσίες επισήμανσης των αλλεργιογόνων στα τρόφιμα, έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη κατάλληλων ταχέων ανοσοχημικών αναλυτικών μεθόδων για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε τρόφιμα, , καθώς και μεθόδων βασισμένων στην ανίχνευση DNA. Επίσης πρόσφατες έρευνες έχουν καθορίσει την ελάχιστη συγκέντρωση ενός αλλεργιογόνου που αρκεί για να παρατηρηθεί αρνητική επίδραση σε ευαίσθητα άτομα (LOAEL:lowest observed adverse-effect level) σε επίπεδα της τάξης 1-2mg τροφίμου που αντιστοιχεί σε μερικά μικρογραμμάρια πρωτεΐνης. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους, διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί στοχεύοντας είτε ολόκληρο το αλλεργιογόνο (πρωτεΐνη) είτε κάποιο τμήμα του (πεπτίδιο). Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αλλεργιογόνων σε τρόφιμα μπορούν να χωριστούν σε :

- ανοσοχημικές μεθόδους (στηρίζονται στην ανίχνευση πρωτεϊνών π.χ. ELISA, RAST/EAST, ανοσοαποτύπωση, βιοαισθητήρες κλπ)
- μεθόδους βασισμένες σε ανίχνευση DNA (π.χ. PCR, RT-PCR, PCR-ELISA κλπ)
- μεθόδους στηριζόμενες σε φασματομετρία μάζας και
- άλλες μεθόδους (π.χ. μη-ειδικές μέθοδοι, προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης κλπ)

Οι ανοσοαναλυτικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τα διάφορα τρόφιμα ανιχνεύουν συνήθως μεταξύ 1 ως 100mg αλλεργιογόνου πρωτεΐνης ανά kg τροφίμου (ppm). Μόλις το 2012 δημοσιεύτηκε οδηγός καλής πρακτικής για τον ποσοτικό προσδιορισμό αλλεργιογόνων σε τρόφιμα με τεχνική ELISA.

Όπως έχει ειπωθεί το κυριότερο αλλεργιογόνο των ψαριών είναι η παρβαλβουμίνη, ενώ το κολλαγόνο μπορεί να δράσει όπως έχει αποδειχθεί ως αλλεργιογόνο. Διάφορες ELISA μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση αλλεργιογόνων ψαριού τόσο σε τρόφιμα όπως οι σούπες, οι σάλτσες και το ψωμί, όσο και σε οίνους, όπου είναι πιθανό να απαντώνται σε ίχνη σαν συνέπεια της χρήσης της ζελατίνης ψαριών ως διαυγαστικό μέσο. Πρόσφατα αναπτύχθηκε ELISA μέθοδος που βασίζεται σε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι

της παρβαλβουμίνης με όριο ανίχνευσης 0,04 ppm, ενώ ανίχνευσή της έχει επιτευχθεί με RT-PCR, η οποία επιδεικνύει ευαισθησία και ειδικότητα ώστε να διαχωρίζει την παρβαλβουμίνη των ψαριών από τις παρβαλβουμίνες άλλων ζωικών οργανισμών. Επιπλέον θα πρέπει να αναφερθούν και οι προσπάθειες ανίχνευσης παρβαλβουμίνης με μεθόδους LC-MS.

Όσον αφορά στα καρκινοειδή και τα μαλάκια το κυριότερο αλλεργιογόνο είναι η τροπομουσίνη. Για την ανίχνευσή της έχουν αναπτυχθεί αρκετές ELISA μέθοδοι με κάποιες από αυτές να επιδεικνύουν υψηλή ειδικότητα (απουσία διασταυρούμενης αντίδρασης με κρέας ιχθύων και θηλαστικών) και χαμηλό όριο ανίχνευσης 1 ppm. Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί ευαίσθητη RT-PCR μέθοδος για την ανίχνευση γονιδίων που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια των καρκινοειδών σε πολλά αντίγραφα, με το όριο ανίχνευσης να κυμαίνεται από 0,1 ppm έως 1 ppm, ενώ LC-MS/MS μέθοδοι έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση και ταυτοποίηση νέων αλλεργιογόνων στα καρκινοειδή.

9.2 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Παρακάτω γίνεται μια σύντομη αναφορά σε ορισμένα πρόσφατα άρθρα που έχουν δημοσιευτεί με σκοπό να αναπτυχθούν συνοπτικά και συγκριτικά κάποιες από τις μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της παρβαλβουμίνης. Σκόπιμο είναι να γίνει μία σύντομη αναφορά στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

ΚΑΤΩΤΕΡΟ ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΩΤΕΡΟ ΟΡΙΟ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Το **Όριο Ανίχνευσης** (Limit of Detection, LOD) ή Αναλυτική ευαισθησία (Analytical Sensitivity) μιας μεθόδου είναι η ελαχίστη συγκέντρωση μιας παραμέτρου που μπορεί να ανιχνευθεί «αξιόπιστα» από τη μέθοδο αυτή. Αλλιώς μπορούμε να ορίσουμε ότι, το Όριο Ανίχνευσης ενός συστατικού με μία μέθοδο είναι η συγκέντρωση για την οποία η απόκλιση της μεθόδου διαφέρει από την απόκλιση του τυφλού κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου του τυφλού. Το **Όριο Ποσοτικοποίησης** (Limit of Quantitation, LOQ) ή Λειτουργική ευαισθησία (Functional Sensitivity) είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου, που μπορεί να προσδιορισθεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Για τον υπολογισμό των LOD και LOQ απαιτείται η γνώση της εξίσωσης της καμπύλης αναφοράς, όπως και η τυπική απόκλιση πολλαπλών μετρήσεων και ειδικά του «χαμηλότερου» προτύπου.

Αν η τυπική απόκλιση των μετρήσεων του χαμηλότερου προτύπου εκφρασμένη σε αναλυτική πληροφορία X (συγκέντρωση ή ποσότητα) είναι sX , τότε είναι:

$$\text{LOD} = 3 \times sX \quad \text{και} \quad \text{LOQ} = 10 \times sX$$

Αν X είναι το αναλυτικό αποτέλεσμα, όπως υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς, διακρίνουμε 3 περιπτώσεις:

- $X < \text{LOD}$. Στην περίπτωση αποφαινόμαστε ότι δεν ανιχνεύτηκε η ουσία A στο δείγμα με τη δεδομένη μέθοδο και αναφέρουμε το LOD της μεθόδου.

- $\text{LOD} < X < \text{LOQ}$. Στην περίπτωση αυτή αποφαινόμαστε ότι ανιχνεύτηκε η ουσία A στο δείγμα με τη δεδομένη μέθοδο χωρίς να δώσουμε αριθμητικό αποτέλεσμα και αναφέρουμε ότι $X < \text{LOQ}$ (δίνοντας την τιμή του LOQ).

- $\text{LOQ} < X$. Στην περίπτωση αυτή αποφαινόμαστε ότι η ουσία A βρίσκεται στο δείγμα στη συγκέντρωση που υπολογίσαμε μέσω της καμπύλης αναφοράς.

Οι όροι αυτοί ακολουθούν τις προδιαγραφές ISO (International Organization for Standardization) και IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) για κάθε μέθοδο που πραγματοποιείται.

9.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΨΑΡΙΑ

Η ανίχνευση των αλλεργιογόνων υπολειμμάτων ψαριών σε τρόφιμα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους σκοπούς της επισημάνσης και τη διαφύλαξη των αλλεργικών στα ψάρια καταναλωτών. Πολλές μέθοδοι ελέγχου ταυτότητας ιχθυηρών που χρησιμοποιούν τεχνικές ηλεκτροφόρησης, ανοσολογικές δοκιμασίες, μεθοδολογία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και υποβοηθούμενη από μήτρα εκρόφησης λέιζερ ιονισμού με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF MS) είναι διαθέσιμες σήμερα.

Τεχνικές ηλεκτροφόρησης, με ισοηλεκτρική εστίαση είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος, με το διαχωρισμό των σαρκοπλασματικών πρωτεϊνών με βάση τη διαφορά ηλεκτρικού φορτίου τους και προσδιορίζει τα είδη ψαριών με βάση τα πρότυπα συγκεκριμένων ειδών και του γνωστού συνόλου πρωτεϊνών ή παρβαλβουμινών (Esteve-Romero et al, 1996; Civera, 2003). Η ανοσοαποτύπωση όπως η ELISA, από την άλλη πλευρά, χρησιμοποιεί είτε μονόκλινα ή πολύκλινα αντισώματα κατά των διαλυτών πρωτεϊνών των μυών, των συγκεκριμένων ειδών ψαριών, χωρίς διασταυρούμενη αντίδραση με άσχετα είδη ψαριών, ώστε να διακρίνει τη διαφορά μεταξύ των διαφόρων ειδών ψαριών. Μέθοδοι που βασίζονται σε PCR περιλαμβάνουν την ενίσχυση περιοχών του DNA που αφορούν την εν λόγω πληροφορία, που είναι καθολική ή συγκεκριμένη για κάποια είδη, ακολουθεί η ανάλυση του κατακερματισμένου DNA για την αναγνώριση ειδών με τη χρήση διαφόρων μεθόδων. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται τεχνικές ηλεκτροφόρησης, προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA, Πολυμορφισμός μήκους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP), (Single Strand Conformation Polymorphism) και πολλές άλλες (Gil, 2007 Rasamussen και Morrissey, 2008; Sun et al, 2009). Η μέθοδος MALDI-TOF MS προσδιορίζει τα είδη ψαριών, σύμφωνα με τα ισόμορφα πρότυπα παρβαλβουμίνης που εμφανίζεται από την δύο διαστάσεων ηλεκτροφόρηση σε συνδυασμό με τη μοναδική MALDI-TOF μάζα αποτυπωμάτων των πεπτιδίων που παράγονται από την υδρόλυση της θρυψίνης των ισομορφών της παρβαλβουμίνης (Carrera et al, 2006). Οι τεχνικές ελέγχου ταυτότητας των ψαριών είναι πολύ συγκεκριμένες για την ανίχνευση απλών ή πολλαπλών ειδών ψαριών. Επιπλέον, είναι ποιοτικές μέθοδοι που είναι επικυρωμένες για να προσδιορίζουν τα είδη ψαριών μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων θαλασσινών και κρέατος ακόμα και ως συστατικά των τυποποιημένων και επεξεργασμένων τροφίμων. Ως εκ τούτου, έχουν περιορισμένη εφαρμογή στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών που προέρχονται από άσχετα είδη εκτός των ψαριών στα τρόφιμα. Για να χρησιμοποιηθούν αυτές οι μέθοδοι ελέγχου ταυτότητας, οι βιομηχανίες τροφίμων πρέπει να έχουν εκ των προτέρων γνώση για τα συγκεκριμένα είδη ψαριών που μπορούν να μολύνουν τις εγκαταστάσεις μονάδας επεξεργασίας ή τα τελικά προϊόντα διατροφής, αλλά αυτή η κατάσταση εμφανίζεται σπάνια στην πραγματικότητα.

Διάφορες έρευνες για την ανάπτυξη μεθόδων, που αποσκοπούν στην ανίχνευση αλλεργιογόνων υπολειμμάτων από ένα ευρύ φάσμα ειδών ψαριών στα τρόφιμα, έχουν δημοσιευθεί. Οι Fæste και Plassen (2008) ανέπτυξαν μια ELISA τύπου σάντουιτς για την ποσοτικοποίηση των ψαριών σε τρόφιμα χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα παρβαλβουμίνης, ως αντίσωμα συλλογής και ανίχνευσης. Η ELISA είχε ένα όριο ανίχνευσης 0,01mg παρβαλβουμίνης/kg τροφίμου, η οποία ήταν ισοδύναμη με 5mg ψαριών/kg τροφής. Ωστόσο, η ανίχνευση της παρβαλβουμίνης ιχθυηρού ήταν ασυνεπής για διαφορετικά είδη ψαριών. Μεταξύ των 32 είδη ψαριών που δοκιμάστηκαν, η ELISA έδειξε τα μεγαλύτερα ποσοστά ανάκτησης (> 50%) για τα ψάρια που καταναλώνονται πιο συχνά, όπως ο μπακαλιάρος, τιλάπια, ο σολομός, ο κυπρίνος, το σκουμπρί. Παρ'όλα αυτά, πολλά ψάρια του γλυκού νερού, συμπεριλαμβανομένης της πέρκας του Νείλου, το χέλι, ο οξύρρυγχος, τούρνες και χονδρυχθίες, το ακανθώδες σκυλόψαρο, παρουσίασαν ανάκτηση μικρότερη από 1%. Μια παρόμοια παρατήρηση έγινε από τους Chen et al (2006) σε σχέση με τη μεταβλητή ανοσοαντιδραστικότητα του εμπορικός διαθέσιμου μονοκλωνικό αντιβάτραχου παρβαλβουμίνη αντίσωμα του ποντικού έναντι των τυχαίων εκχυλισμάτων από διάφορα είδη ψαριών. Οι Gajewski και Hsieh et al (2009) ανέπτυξαν πρόσφατα ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ακατέργαστου υπολείμματος από τις μαγειρεμένες μυϊκές πρωτεΐνες του γατόψαρου. Οι συγκρίσεις των αντισωμάτων τους με το εμπορικά διαθέσιμο μονοκλωνικό αντίσωμα παρβαλβουμίνης ποντικού αντι-βάτραχος κατέδειξε περαιτέρω απόδειξη της μεταβλητής εξειδίκευσης και των δύο αντισωμάτων κατά του μαγειρεμένου εκχυλίσματος από διαφορετικά είδη ψαριών. Η ποσοτική παραλλαγή της ELISA όταν ανιχνεύει διάφορα είδη ψαριών θα μπορούσε να αποδοθεί στη μεταβλητή ποσότητα παρβαλβουμίνης που είναι παρούσα στα εκχυλίσματα των ψαριών και στις διαφορές στην συγγένεια δέσμευσης του αντισώματος με το αντιγόνο (Chen et al, 2006). Ως εκ τούτου, η χρησιμοποίηση του αντισώματος αντι-παρβαλβουμίνη, που έχει ίση ειδικότητα σε παρβαλβουμίνες από διάφορα είδη ψαριών θεωρείται ότι είναι πιο πλεονεκτική για την ποσοτικοποίηση των καταλοίπων ψαριών σε τρόφιμα. Παρά το γεγονός ότι το μονοκλωνικό αντισώματα έχει επίσης παραχθεί κατά της παρβαλβουμίνης του κυπρίνου και του κόκκινου τόνου (Kawase et al, 2001), η διασταυρούμενη αντίδραση αυτών των αντισωμάτων με διάφορα είδη ψαριών είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Μια εναλλακτική λύση για τα αντισώματα της αντι-παρβαλβουμίνης είναι η ανάπτυξη αντισωμάτων που αναγνωρίζουν ειδικές πρωτεΐνες ή πεπτίδια ψαριών που διατηρούνται σε

όλα τα είδη ψαριών, αλλά δεν δείχνουν διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα μη θαλασσινά είδη.

Οι Lu et al (2008) ανέφεραν την πρώτη ταχεία SPR βιοαισθητήρα (Οπτοηλεκτρονικοί Βιοαισθητήρες Συντονισμού Επιφανειακών Πλασμονίων - Surface Plasmon Resonance) για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αλλεργιογόνου των ψαριών, την παρβαλβουμίνη. Η SPR είναι η συλλογική ταλάντωση των ηλεκτρονίων σε ένα στερεό ή υγρό που διεγείρεται από προσπίπτον φως. Η συνθήκη συντονισμού αποδεικνύεται, όταν η συχνότητα των φωτονίων ταιριάζει με τη φυσική συχνότητα των ηλεκτρονίων της επιφάνειας ταλάντωσης ενάντια στην δύναμη επαναφοράς των θετικών πυρήνων. Η SPR σε δομές μεγέθους νανόμετρου ονομάζεται εντοπισμένος επιφανειακός συντονισμός πλασμονίου. Το όριο ανίχνευσης για την παρβαλβουμίνη προσδιορίστηκε σε 3.55μg/L με βάση την κινητική ανάλυση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της καθαρής παρβαλβουμίνης του κυπρίνου και το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της παρβαλβουμίνης του ερυθρού τόνου (MAb EG8) Επιπλέον η SPR ανάλυση βιοαισθητήρα του κέικ σαρδέλας και του αποξηραμένου παλαμιδίου αποκάλυψε ότι το MAb EG8 είναι δεσμευμένο σε ένα κοινό επίτοπο της παρβαλβουμίνης σε ψάρια από διαφορετικές πηγές τροφίμων. Αν και αυτή η ανάλυση έδειξε δυναμικότητα στη χρήση για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της παρβαλβουμίνης στα ψάρια, η εφαρμοσιμότητα αυτής της δοκιμασίας, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης της παρβαλβουμίνης που προέρχεται από πρόσθετα είδη ψαριών και την ποσοτικοποίηση της παρβαλβουμίνης ψαριών σε σύνθετες μήτρες τροφίμων δεν έχει αναφερθεί. Το 2007, οι Choi και Hong (2007) δημοσίευσαν μία μέθοδο PCR χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν συγκεκριμένα το γονίδιο παρβαλβουμίνης για το σκουμπρί. Ωστόσο, η χρήση αυτής της μεθόδου περιορίζεται στην ανίχνευση αλλεργιογόνων υπολειμμάτων που προέρχονται από το σκουμπρί, αλλά όχι σε άλλα είδη ψαριών.

Οι Sun et al (2009) αργότερα ανέπτυξαν μια μέθοδο Real time PCR με σκοπό την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση το γονίδιο της παρβαλβουμίνης σε 28 από 30 είδη ψαριών, με τις εξαιρέσεις της χρυσής τσιπούρας και του κιτρινόπτερου τόνου. Η ευαισθησία της δοκιμασίας είχε αναφερθεί ως 5 pg καθαρού DNA των ιχθύων. Η εργασία του δεν καταμέτρησε το DNA από 13 είδη που δεν άνηκαν στα ψάρια. Στη μελέτη αυτή, ίδιος αριθμός δειγμάτων ψαριών επιβεβαιώθηκε να είναι διαφορετικός σε

αριθμούς αντιγράφων του γονιδίου παρβαλβουμίνης. Ανάμεσα σε 30 είδη ψαριών που περιλαμβάνονται, ο αριθμός αντιγράφων της πράσινης χωματίδας ήταν ο χαμηλότερος. Ωστόσο, ακόμη και ίχνη της πράσινης χωματίδας (5 pg) μπορεί να ανιχνεύονται με την αναπτυχθείσα μέθοδο. Αυτό υποδεικνύει ότι είναι εφικτό να χρησιμοποιηθεί το τμήμα του γονιδίου της παρβαλβουμίνης ως ανίχνευση δείκτη του αλλεργιογόνου των ψαριών, και η αναπτυγμένη μέθοδος PCR πραγματικού χρόνου είναι ένα πιθανό εργαλείο για την ανίχνευση και τη διαχείριση της επισήμανσης του αλλεργιογόνου των ψαριών στα τρόφιμα. Όπως αναφέρθηκε από τους συγγραφείς, απαιτείται περισσότερη έρευνα για να εξακριβώσει την εφαρμογή της μεθόδου για πρόσθετα είδη ψαριών και να συσχετίσει τους αριθμούς αντιγράφων του DNA με το πραγματικό ποσό των αλλεργιογόνων υπολειμμάτων ψαριών που βρίσκονται στα τρόφιμα.

Ο Hildebrandt (2010) ανέπτυξε πρόσφατα μια νέα Πολυαναλυτική Μέθοδο (xMAPTM-microwave-assisted process) που βασίζεται στην τεχνολογία που ανιχνεύει τα γονίδια της παρβαλβουμίνης σε τουλάχιστον 8 αλλεργιογόνα είδη ψαριών χωρίς ενίσχυση DNA από μοσχάρι, αρνί, κοτόπουλο, χοιρινό, γαλοπούλα, γαρίδες, ή σούπα λαχανικών. Αυτή η μέθοδος συνδύασε την PCR ενίσχυση του DNA κωδικοποιώντας την παρβαλβουμίνη και χρησιμοποιώντας έναν universal εκκινητή κατάλληλο για ιχθυηρά που στοχεύει ένα εξαιρετικά διατηρημένο εξώνιο στην περιοχή αλληλουχίας της παρβαλβουμίνης ιχθύος. Ακολούθησε η εφαρμογή της τεχνολογίας σε xMAPTM για την ανίχνευση της παρουσίας του γονιδίου της παρβαλβουμίνης ιχθύος χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν στην συγκεκριμένη κατά είδος περιοχή ιντρονίου στο γονίδιο. Η ανίχνευση των ειδικά ενισχυμένων δειγμάτων του μυϊκού ιστού του Ατλαντικού σολομού σε άψητη σούπα λαχανικών έδειξε ένα όριο ανίχνευσης 0,02% (20mg φιλέτο σολομού σε 100 g σούπας). Αυτή η μέθοδος θα μπορούσε θεωρητικά να ανιχνεύσει έως και 10 0 είδη ψαριών ταυτόχρονα σε ένα δείγμα, αλλά χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να επικυρώσει τα αποτελέσματα της μεταποίησης και τις μήτρες των τροφίμων για την απόδοση της δοκιμασίας. Όπως σημειώνεται από τον συγγραφέα, η μέθοδος ανιχνεύει DNA και όχι αλλεργιογόνο πρωτεΐνη. Παρά τον περιορισμό, η χρήση του DNA ως δείκτης για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα ψάρια είναι πιο συμφέρουσα από τη μέθοδο με βάση τις πρωτεΐνες λόγω της διαφορετικής κατανομής των πρωτεϊνών παρβαλβουμίνης μέσα στους ιστούς των ψαριών.

Το άρθρο που αφορά την ανάπτυξη μιας γρήγορης **in-house** μέθοδου PCR σε πραγματικό χρόνο για την ανίχνευση του αλλεργιογόνου των ψαριών σε τρόφιμα και σε σύγκριση με ένα εμπορικό kit δημοσιεύτηκε στις 19 Νοεμβρίου 2013 από τους Beatriz Herrero, Juan M. Vieites, Montserrat Espíreira. Η εργασία αυτή είναι σημαντική, διότι είναι η πρώτη, ταχεία μέθοδος πραγματικού χρόνου PCR που έχει αναπτυχθεί μέχρι σήμερα για την ανίχνευση ψαριών στον τομέα των μεταποιημένων προϊόντων διατροφής. Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο αυτή μαγειρεύτηκαν στους 99 °C σε νερό για 20 λεπτά και το νερό χρησιμοποιήθηκε για να φανερωθούν οι διαφορετικές μήτρες των τροφίμων και των μεταποιημένων προϊόντων, οι οποίες προσομοιώνονται με κονσέρβες και με προμαγειρεμένα τρόφιμα. Η ποσότητα του DNA που υπάρχει στο μαγειρεμένο νερό ήταν η χαμηλότερη συγκέντρωση που εντοπίστηκε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της μεθόδου. Ο στόχος αυτής της επικύρωσης της μεθόδου ήταν να αποδείξει ότι οι επεξεργασίες που εφαρμόζονται στα μεταποιημένα προϊόντα δεν επηρεάζουν την ανίχνευση μέσω της PCR πραγματικού χρόνου της μόλυνσης/νοθείας των ιχθυηρών. Η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού που επέτρεψε τη σωστή ανίχνευση των ψαριών ήταν 60 °C. Οι μέσες τιμές των Cq που επιτεύχθηκαν ήταν 20 ± 2 σε νωπά και κατεψυγμένα ψάρια με συγκέντρωση από 100 ng του DNA. Οι συνθήκες της τεχνολογικής επεξεργασίας όπως το μηχανικό stress, η υψηλή θερμοκρασία, οι μεταβολές του pH, οι ενζυμικές δραστηριότητες, οι ζυμώσεις ή η πίεση μπορεί να οδηγήσει στην υποβάθμιση του DNA ή στη μείωση της αποτελεσματικότητας της ενίσχυσης ειδικά σε επεξεργασμένα τρόφιμα. Αυτή η μέθοδος παρέχει πλεονεκτήματα σε σχέση με την ακρίβεια, την ευαισθησία, την ειδικότητα, το δυναμικό εύρος, την ικανότητα υψηλής απόδοσης και το χαμηλότερο κίνδυνο μόλυνσης, ενώ μειώνει το χρόνο για την ανάλυση στα 43 λεπτά. Η μέθοδος αυτή είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση θεμάτων σχετικά με την ποιότητα των τροφίμων και την ασφάλεια τους, καθώς και για την επαλήθευση της εφαρμογής των κανονισμών σήμανσης για την εξασφάλιση της προστασίας του καταναλωτή.

Οι Shibahara et al., 2012 χρησιμοποίησαν μια μη ανταγωνιστική μέθοδο ELISA (sandwich), με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος προερχόμενου από σκουμπρί Ειρηνικού. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίηση βρέθηκαν LOD=0,58 ng/ml και LOQ=1,76 ng/ml, αντίστοιχα. Δηλαδή, η ελαχίστη συγκέντρωση πρωτεΐνης σε τρόφιμο που μπορεί να ανιχνευτεί είναι 0,23 Ig και η ελάχιστη συγκέντρωσή της που μπορεί να

μετρηθεί είναι 0,70 Ig/g. Η ELISA έδειξε 22,6-99,0% αντιδραστικότητα στις παρβαλβουμίνες διαφόρων ιχθυηρών. Συμπερασματικά κρίνεται χρήσιμο εργαλείο για ανίχνευση πρωτεΐνης ψαριού σε επεξεργασμένα τρόφιμα.

Η δημοσίευση του άρθρου που αφορά την ανίχνευση παρβαλβουμίνης με ανοσοαποτύπωση έγινε στις 13/10/2001 από τους Kanamori et al. Η συγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης είχε απήχηση σε 5 είδη ψαριών και καταλήγει ότι δεν είναι μόνο χρήσιμη για την ανίχνευση αλλεργιογόνων ιχθυηρών με ανοσοαποτύπωση, αλλά και για την προετοιμασία αντιγόνων για τη διάγνωση αλλεργικής αντίδρασης στα ψάρια με μέθοδο RAST (Radioallergosorbent, ραδιοανοσολογικό τεστ)

Επιπλέον έχουν γίνει προσπάθειες ανίχνευσης της παρβαλβουμίνης με τη μέθοδο MS/MS. Στην εργασία που δημοσιεύτηκε στις 3/04/2012 από τους Carrera et al. παρουσιάζεται μία γρήγορη και άμεση ανίχνευση των αλλεργιογόνων του ψαριού σε οποιοδήποτε τρόφιμο. Η προτεινόμενη μεθοδολογία αφορά την εκκαθάριση της β-παρβαλβουμίνης με θέρμανση και χρήση υπερηχητικού περιβάλλοντος με High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) και την παρακολούθηση 19 μόνο πεπτιδίων της β-παρβαλβουμίνης με επιλεγμένο MS/MS Ion Monitoring (SMIM) σε μία γραμμική παγίδα ιόντων του φασματοφωτομέτρου. Η εν λόγω στρατηγική επιτρέπει την άμεση ανίχνευση της β-παρβαλβουμίνης σε οποιοδήποτε τρόφιμο σε λιγότερο από 2 ώρες.

Η δημοσίευση του άρθρου που σχετίζεται με την ανίχνευση παρβαλβουμίνης με ανοσοδοκομή παράπλευρης ροής πραγματοποιήθηκε στις 17/01/2012 από τους Zheng et al., οι οποίοι ανέπτυξαν μία ποσοτική ανοσοδοκιμή παράπλευρης ροής βασισμένη σε υπερπαραμαγνητική ανίχνευση νανοσωματιδίων για την παρβαλβουμίνη. Η δοκιμή της παράπλευρης ροής που βασίζεται σε αυτή τη μέθοδο αποδίδει ποσοτική μέτρηση με το να διαβάσει τα μαγνητικά σήματα από ένα ειδικό μαγνητικό σύστημα, το οποίο ονομάζεται MAR (Magnetic Assay Reader). Τα μαγνητικά σήματα που παρέχονται από τη μέθοδο αυτή είναι αρκετά σταθερά καθιστώντας δυνατή την επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης είναι LOQ= 5 mg/ml και LOD= 0,046 mg/ml. Η μέθοδος προκύπτει να είναι γρήγορη, ακριβής και απλή και θα μπορούσε να βελτιώσει σημαντικά την απόδοση για τον έλεγχο μεγάλης κλίμακας ανίχνευσης της παρβαλβουμίνης.

Τέλος, η ικανότητα των τεχνικών LC-MS/MS να ανιχνεύουν πρωτεΐνες ή πεπτίδια ακόμα και σε μικτά μίγματα, από επεξεργασμένα και μη επεξεργασμένα τρόφιμα, τις καθιστά σε πλεονεκτική θέση. Το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται ψευδο-θετικά αποτελέσματα τις συνιστά ιδανικές για την επικύρωση των ELISA και PCR. Η άμεση πρόσβαση σε αρχείο MS/MS μπορεί εύκολα να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σε αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης με μια πλήρη κατατομή όλων των μορφών της πρωτεΐνης στόχου που βρίσκεται στο δείγμα. Οι αναλυτικές τεχνικές εύκολα ξεπερνούν την αστάθεια των ανοσοχημικών ή μοριακών συστημάτων που χρησιμοποιούνται σε ELISA και PCR, προσφέροντας έτσι αναπαραγωγιμότητα και επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα. Με όριο ανίχνευσης κατώτερο από 1ppm, εξαρτώμενο της μεθόδου, η ευαισθησία της μεθόδου είναι συγκρίσιμη με της ELISA. Ωστόσο η ευαισθησία της παραμένει χαμηλότερη σε σχέση με της PCR, που σε ορισμένες περιπτώσεις λιγότερο από 10 γενώματα είναι αρκετά για πολλαπλασιασμό και ποσοτικοποίηση. Κύριο μειονέκτημα είναι το υψηλό επενδυτικό κόστος, όπως και η υψηλά εξειδικευμένη γνώση που απαιτεί. Βέβαια, πλεονεκτεί στην ταυτόχρονη επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση πάνω από 12 ειδών με μία απλή προετοιμασία δείγματος. Συμπερασματικά, οι τρεις τεχνικές που αναφέρονται, σε συνδυασμό, είναι χρήσιμες για τη βιομηχανία τροφίμων διότι συμβάλλουν σε καλύτερη απόφασή της για τη διαχείριση του κινδύνου, προστατεύοντας τις μάρκες τους από την απόσυρση και τα πρόστιμα.

Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που δημοσιεύτηκαν μέχρι τώρα, ανεξάρτητα από το αν βασίζονταν σε πρωτεϊνική ή σε DNA μέθοδο για την ανίχνευση αλλεργιογόνων υπολειμμάτων ψαριών, είχαν μια παρόμοια έλλειψη, η οποία εκφράζει την ανικανότητα των υφιστάμενων μεθόδων στην ανίχνευση των άγνωστων καταλοίπων ψαριών που προέρχονται από όλα τα είδη των ιχθυηρών σε τρόφιμα. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη των ευρύτερων μεθόδων για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα ψάρια παραμένει ένας χώρος για περισσότερη έρευνα και βελτίωση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

10.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αλλεργιογόνου παρβαλβουμίνη (Parvalbumin) σε ψάρια της Μεσογείου με την εφαρμογή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (RealTimePCR).

Τα βασικά μέρη της πειραματικής εργασίας περιλαμβάνουν :

- Απομόνωση DNA από διαφορετικά είδη ιχθυηρών
- Εφαρμογή της μεθόδου RealTimePCR για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αλλεργιογόνου παρβαλβουμίνης

10.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σε όλα τα δείγματα αρχικά έγινε κατεργασία για ομογενοποίηση. Τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν, προέρχονταν από την ελληνική αγορά και αγοράστηκαν από την κεντρική αγορά της Αθήνας, καθώς και από διάφορες λαϊκές αγορές.

Από τα ως προς εξέταση δείγματα, λήφθηκε αρκετή ποσότητα υγιούς σάρκας, μεταφέρθηκε σε blender για ομογενοποίηση και στη συνέχεια 10-20 mg τοποθετήθηκε στα ειδικά erpendorf για να διεξαχθεί το πείραμα.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται παρακάτω:

N_o	ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ		ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
1	Γαύρος	Anchovy	<i>Engraulis encrasicolus</i>
2	Κολιός	Chub mackerel	<i>Scomber japonicus</i>
3	Σαυρίδι	Horse mackerel	<i>Trachurus trachurus</i>
4	Σαργός	White sea bream	<i>Diplodus sargus</i>
5	Μπαρμπούνι 1	Red mullet 1	<i>Mullus sumuletus</i>
6	Μαρίδα	Picarel	<i>Spicara smaris</i>
7	Λυθρίνι	Common pandora	<i>Pagellus erythrinus</i>
8	Μελανούρι	Saddled bream	<i>Oblada melanura</i>
9	Τσιπούρα	Gilthead sea bream	<i>Sparus aurata</i>
10	Φαγκρί	Red sea bream	<i>Pagrus major</i>
11	Λαβράκι	European sea bass	<i>Dicentrarchus labrax</i>

12	Σουπιά	Cuttlefish 1	<i>Sepia officinalis</i>
13	Σαρδέλα	Sardine	<i>Sardina pilchardus</i>
14	Μοσχοχτάποδο	Musky Octopus	<i>Eledone moschata</i>
15	Μπαρμπούνι 2	Red mullet 2	<i>Mullus sumuletus</i>
16	Σουπιά 2	Cuttlefish 2	<i>Sepia officinalis</i>
17	Ρόδινη γαρίδα 1	Pink shrimp 1	<i>Penaeus sp</i>
18	Σκουμπρί	Atlantic mackerel	<i>Scomber scombrus</i>
19	Χταπόδι	Octopus	<i>Octopus vulgaris</i>
20	Κυδώνι	Warty venus	<i>Venus verrucosa</i>
21	Καλαμάρι	Squid	<i>Loligo vulgaris</i>
22	Ρόδινη γαρίδα 2	Pink shrimp 2	<i>Penaeus sp</i>
23	Καραβίδα	Norway lobster	<i>Nephrops norvegicus</i>
24	Γυαλιστερή	Brown venus	<i>Callista chione</i>
25	Μύδι Μεσογείου	Mediterranean mussel	<i>Mytilus galloprovincialis</i>

Πίνακας 1: Δείγματα ιχθυηρών για το πειραματικό μέρος

Απομόνωση DNA των δειγμάτων ιχθυηρών

Οι ιστοί των ιχθυηρών περιέχουν εκτός από DNA, διάφορες προσμίξεις όπως RNA πρωτεΐνες κ.α. οι οποίες πρέπει να απομακρυνθούν ώστε να απομονωθεί καθαρό DNA κατάλληλο για τις αντιδράσεις PCR. Στην παρούσα πτυχιακή η απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε με τις εμπορικές μεθόδους Nucleospin food Genomic DNA (Macherey-Nagel) και Bioo scientific. Σε όλες τις διαδικασίες απομόνωσης τηρήθηκαν οι κατάλληλες ασφαλιστικές συνθήκες. Η απομόνωση DNA με τις εμπορικές μεθόδους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών με μικρές τροποποιήσεις.

Σε όλες τις μεθόδους απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος εξοπλισμός :

- Σπάτουλες
- Μίξερ για την ομογενοποίηση των τροφίμων
- Πιπέτες και τα αντίστοιχα tips
- Πλαστικοί σωλήνες 1,7 ml (τύπου eppendorf)
- Vortex (MS2 Minishaker)
- Φυγόκεντρος (Biofuge pico)
- Θερμομπλόκ (M501-HB, MPM Instruments s.r.l)
- Καταψύκτης

A.BIOO SCIENTIFIC

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται στο kit είναι :

- Lysis Solution
- Proteinase K & Buffer για την διάλυσή της

- Protein Precipitation Solution
- 75% αιθανόλη
- Nucleic acid resuspension solution

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε

- Ισοπροπανόλη
- Πάγος



Εικόνα 20: Bioo scientific kit

Μέθοδος

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, με κάποιες αλλαγές. Η πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω :

- 10-20 mg ομογενοποιημένου δείγματος τροφίμου, προστέθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες τύπου erpedorf του 1,7ml.
- Προστέθηκαν 500ml Lysis Solution και 10 ml πρωτεϊνάσης K. Ανακινήθηκαν έντονα με vortex.

- Ο όγκος του διαλύματος Lysis solution που προστίθεται πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές πολλαπλάσιος του όγκου της ποσότητας του ομογενοποιημένου τροφίμου που εξετάζεται. Για καλύτερη λειτουργία του διαλύματος αυτού, στα πειράματα προσθέτονταν μεγαλύτερη ποσότητα Lysis solution και αναλογικά αυξανόταν και η ποσότητα της πρωτεΐνης K.
- Οι πλαστικοί σωλήνες οδηγήθηκαν σε θερμομπλόκ για επώαση. Για καλύτερη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και απελευθέρωση του νουκλεϊκού οξέος, στο πείραμα τα δείγματα αφήνονταν να επώασουν over night.
- Προστέθηκαν 175μl Protein Precipitation Solution και ακολούθησε vortex για περίπου 20 sec.
- Φυλάχθηκαν σε πάγο για 5 min.
- Φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρθηκε το 90% του καθαρού υπερκείμενου κάθε σωλήνα σε καινούριους αριθμημένους πλαστικούς σωλήνες τύπου erpedorf του 1,7ml.
- Προστέθηκε 1,1 όγκος ισοπροπανόλης και ανακινήθηκε σε vortex. Για υπερκείμενο διάλυμα όγκου 0,7 ml, προστέθηκαν 0,77ml ισοπροπανόλης σε αυτό.
- Φυγοκεντρήθηκε για 10min στις 12.000 rpm.
- Το νέο υπερκείμενο απομακρύνθηκε με προσεκτική απόχυση. Ένα μικρό λευκό ίζημα είναι συνήθως ορατό.
- Προστέθηκαν 600μl αιθανόλης 75% και ανακινήθηκαν έντονα όπου εκτοπιστεί το ίζημα.
- Φυγοκεντρήθηκαν για 1 min στις 12.000 rpm.
- Απομακρύνθηκε η μέγιστη δυνατή ποσότητα του υπερκείμενου από τον πλαστικό σωλήνα. Για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης μετά την προσεκτική απόχυσή

της, θερμάνθηκαν οι πλαστικοί σωλήνες με ανοιχτά τα καπάκια τους σε θερμομπλόκ έως την πλήρη εξάτμισή της.

- Προστέθηκαν στους σωλήνες 150μl Nucleic acid resuspension solution για την επαναδιάλυση του DNA και ακολούθησε vortex για περίπου 5-10sec.
- Οι σωλήνες θερμάνθηκαν για 5 min στους 55-60 °C με σκοπό την διαλυτοποίηση του DNA.
- Ακολούθησε ανακίνηση σε vortex.
- Φυλάχθηκαν σε κατάψυξη στους -20 °C.

B. NucleoSpin Food Geonomic DNA from Food MACHEREY-NAGEL

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται στο kit είναι :

- Lysis Buffer CF
- Buffer C2
- Buffer C3
- Wash Buffer C5
- Wash Buffer CQW
- Elution Buffer CE
- Proteinase K & Buffer για την διάλυσή της
- NucleoSpin® Food Columns & Collection Tubes (2ml)

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε

- Αιθανόλη

Μέθοδος

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών, με κάποιες αλλαγές. Η πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω :

- Μεταφέρθηκαν 200mg σε πλαστικό σωλήνα eppendorf του 1,7 ml.
- Προστέθηκαν 550 µl διαλύματος CF, προθερμασμένο στους 65 °C και ανακινήθηκε για 15 sec.
- Επιπλέον προστέθηκαν 10 µl πρωτεΐνάσης K και ανακινήθηκε για 2 sec.
- Όταν ο όγκος του Lysis Buffer (CF) δεν ήταν αρκετός για να διαλυθεί το δείγμα πλήρως, γινόταν προσθήκη περισσότερου Buffer (και πρωτεΐνάσης K ανάλογα) μέχρι το δείγμα να ομογενοποιηθεί πλήρως.
- Πραγματοποιήθηκε επώαση over night για καλύτερη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και απελευθέρωση του νουκλεϊκού οξέος.
- Μεταφέρθηκε το καθαρό υπερκείμενο σε καθαρό πλαστικό σωλήνα τύπου eppendorf του 1,7 ml. Προστέθηκε ίσος όγκος Buffer C4 και ίσος όγκος αιθανόλης. Ακολούθησε vortex για 30sec.
- Τοποθετήθηκε μια στήλη (NucleoSpin Column), στον ειδικό σωλήνα συλλογής (2ml) του kit (Collect tube).
- Μεταφέρθηκε το μίγμα από τον πλαστικό σωλήνα τύπου eppendorf του 1,7 ml, (max 700µl) στον προαναφερθέντα σωλήνα συλλογής. Αυτό φυγοκεντρήθηκε για 1min στις 11.000 rpm. Απορρίφθηκε το υποκείμενο που περιέχεται στο σωλήνα συλλογής.
- Επανάληψη αυτού του βήματος για τον υπόλοιπο όγκο που βρίσκεται στον αρχικό πλαστικό σωλήνα eppendorf του 1,7 ml.

- (1^η έκλυση) Προστέθηκαν 400μl Buffer CQW, μέσα στη στήλη. Φυγοκεντρήθηκαν για 1min στις 11.000 rpm. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό του σωλήνα συλλογής.
- (2^η έκλυση) Προστέθηκαν 700μl Buffer C5, μέσα στη στήλη. Φυγοκεντρήθηκαν για 2min στις 11.000 rpm. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό του σωλήνα συλλογής.
- (3^η έκλυση) Προστέθηκαν 200μl Buffer C5, μέσα στη στήλη. Φυγοκεντρήθηκαν για 2min στις 11.000 rpm. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό του σωλήνα συλλογής.
- Τοποθετήθηκε η στήλη σε νέο πλαστικό σωλήνα τύπου eppendorf του 1,7ml. Προστέθηκαν 100μl Elution Buffer, προθερμασμένου στους 70 °C, μέσα στον πλαστικό σωλήνα. Παραμονή 5min σε θερμοκρασία δωματίου μέσα στον πλαστικό σωλήνα. Παραμονή 5min σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C). Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντριση για 1 min στις 11.000 rpm, ώστε να διαλυθεί το DNA.α δείγματα φυλάχθηκαν σε κατάψυξη στους -20 °C.

10.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Προκειμένου να γίνει έλεγχος της ποιότητας του DNA που απομονώθηκε πραγματοποιήθηκε ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Για τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκαν δύο συσκευές των 16 και 14 θέσεων. Η πρώτη μοντέλο SHU13 της εταιρείας SIGMA-ALDRICH με τροφοδοτικό CONSORT E132 και η δεύτερη μοντέλο OWL EASYCAST® B1 της εταιρείας Thermo SCIENTIFIC και τροφοδοτικό MAJOR SCIENCE MP-250.

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτρόφηση δειγμάτων DNA και προϊόντων PCR σε πηκτώματα συγκεντρώσεων 1% και 2% αντίστοιχα.

Τηρήθηκαν οι απαραίτητες συνθήκες (γάντια, καθαριστικά) ώστε να αποφευχθούν πιθανές επιμολύνσεις, σε χώρο αποκλειστικά για ηλεκτροφόρηση.

Εξοπλισμός- Αντιδραστήρια

- Τροφοδοτικό συσκευής ηλεκτροφόρησης
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Σκόνη αγαρόζης (NIPPON)
- Σπάτουλα
- Κωνικές φιάλες 250ml και 1L
- Ογκομετρικός κύλινδρος 100ml και 1L
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris-borate_EDTA) powder (1 σακουλάκι ανά 1000ml απιονισμένο H₂O) (TAKARA BIO INC)
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Αυτοκόλλητη ταινία
- Αναλυτικός ζυγός (440-35N, KERN)
- Απιονισμένο νερό
- Μαγνητική θερμαντική πλάκα (ISOPAD)
- Βρωμιούχο εθίδιο (EtBr) (SIGMA)
- Ρυθμιστικό φόρτωσης (Invitrogen 10x Blue Juice™ & takara 10x loading buffer)
- DNA δειγμάτων ή προϊόντα PCR
- Ladder (Invitrogen 100bp DNA ladder & takara 20bp DNA ladder)
- Πιπέτες και tips
- Γάντια
- Τράπεζα λάμπας υπεριώδους (BIO RAD)

Μέθοδος

- Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE

Σε κωνική φιάλη του 1L, διαλύουμε ένα σακουλάκι TBE σε 1000ml απιονισμένο νερό. Για πλήρη διάλυσή του χρησιμοποιούμε μαγνητική θερμαντική πλάκα.

- Προετοιμασία δίσκου πηκτώματος

Στεγανοποίηση του δίσκου πηκτώματος με αυτοκόλλητη ταινία στις ανοιχτές πλευρές του και τοποθέτηση της χτένας δειγμάτων στη σωστή θέση.

- Δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης

Σε κωνική φιάλη των 250ml διαλύεται ποσότητα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Οι ποσότητες εξαρτώνται (όπως φαίνεται παρακάτω από το είδος της ηλεκτροφόρησης και από την συσκευή).

A. Είδος ηλεκτροφόρησης

Για την δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης στη συσκευή 16 θέσεων χρησιμοποιούνται 150ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE.

Για την δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης στη συσκευή 14 θέσεων χρησιμοποιούνται 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE.

B. Συσκευή

Για την ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA, δημιουργείται πήκτωμα αγαρόζης 1%. Άρα χρησιμοποιείται 1g σκόνης αγαρόζης/100ml ρυθμιστικού διαλύματος.

Η φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται έως ότου η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως. Αυτό επιτυγχάνεται με θέρμανση σε σχετικά μέτρια ένταση με επαναλαμβανόμενα μικρά διαστήματα θέρμανσης και ανάδευση της φιάλης μεταξύ των διαστημάτων. Έτσι επιτυγχάνεται η καλύτερη διάλυση της αγαρόζης στο ρυθμιστικό και αποφεύγονται οι πιθανές εξατμίσεις, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκεντρώσεως του πηκτώματος. Εν συνεχεία, η κωνική φιάλη αφήνεται να κρυώσει λίγο (σε θερμοκρασία που

το περιεχόμενό της να παραμένει ακόμα ρευστό). Έπειτα, στο περιεχόμενο της κωνικής φιάλης προστίθεται βρωμιούχο εθίδιο (10-15μl), πραγματοποιείται ελαφριά ανάδευση και απόχυση αυτού στον ήδη συναρμολογημένο δίσκο της συσκευής. Η απόχυση γίνεται αρχικά περιφερειακά του δίσκου για διασφάλιση της στεγανοποίησης. Άφεση της αгарόζης να πήξει και όταν το πήκτωμα είναι έτοιμο αφαιρούνται προσεκτικά οι ταινίες και η χτένα δειγμάτων ώστε να μην δημιουργηθούν σχισμές στο πήκτωμα.

- Τοποθέτηση του δίσκου με το πήκτωμα αгарόζης στο θάλαμο ηλεκτροφόρησης.
- Προσθήκη αρκετής ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος TBE ώστε να καλυφθεί το πήκτωμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποχύνεται αρχικά πάνω από τα πηγάδια των δειγμάτων ώστε να γεμίσουν και να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες αέρα εντός των πηγαδιών.
- Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση.

Στα δείγματα προστίθενται κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (2-3μl διάλυμα φόρτωσης/10μl δείγμα) και αναμειγνύεται καλά.

- Φόρτωση δειγμάτων στο πήκτωμα.

Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων (10μl δείγματος) στα πηγάδια του πηκτώματος με την επιθυμητή σειρά, η οποία καταγράφεται. Για αποφυγή επιμολύνσεων χρησιμοποιείται διαφορετικό tip για κάθε δείγμα.

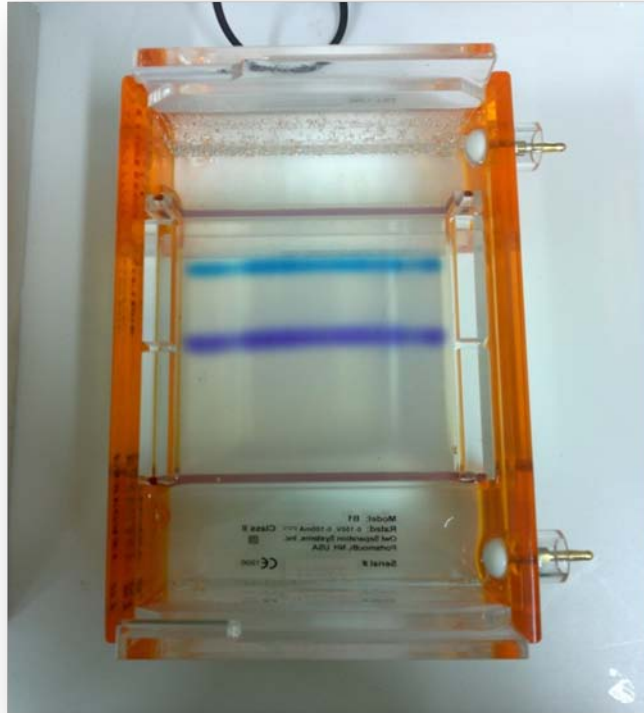
- Φόρτωση ladder στο πήκτωμα.

Σε περίπτωση που η ηλεκτροφόρηση γίνεται για προϊόντα PCR, τότε απαιτείται και DNA ladder. Τοποθετείται είτε στη μεσαία θέση του πηκτώματος είτε στις ακραίες, με ποσότητα 6-7μl.

- Κλείσιμο της συσκευής, τοποθετώντας το καπάκι πάνω από το θάλαμο. Σύνδεση της συσκευής με τη μονάδα τάσης (τροφοδοτικό) έτσι ώστε η μετακίνηση των δειγμάτων πάνω στο πήκτωμα να πραγματοποιείται προς τη σωστή κατεύθυνση. Εφαρμόζεται τάση ρεύματος 120-120Volt. Ελέγχεται η παροχή του ρεύματος κατά την

ηλεκτροφόρηση με την εμφάνιση φυσαλίδων στα ηλεκτρόδια της ανόδου (O_2) και της καθόδου (H_2).

- Ολοκλήρωσης της ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 21: Μετακίνηση δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση έχει ολοκληρωθεί όταν τα δείγματα έχουν μεταναστεύσει αρκετά. Αυτό φαίνεται με την μετακίνηση των βαφών της χρωστικής (δείγμα φόρτωσης) που πρέπει να έχει προχωρήσει αρκετά χωρίς να εξέλθει από το πήκτωμα. Τότε η συσκευή αποσυνδέεται από το ρεύμα και ανοίγεται.

- Το πήκτωμα φέρεται στην τράπεζα λάμπας υπεριώδους (BIO RAD).



Εικόνα 22: Τράπεζα λάμπας υπεριώδους (BIO RAD)

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης ήταν ένα σημαντικό μέσο για την ποιοτική διαπίστωση της επιτυχούς απομονώσεως και παρουσίας του DNA στα δείγματα που εξετάστηκαν. Τα δείγματα DNA των εξεταζόμενων ιχθυηρών οδηγήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αλλεργιογόνου γονιδίου της παρβαλβουμίνης.

10.4 REAL TIME PCR

Για την εξέταση των δειγμάτων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα StepOne Plus Real Time PCR της εταιρίας Applied Biosystems International. Τα δείγματα προήλθαν από τις απομονώσεις DNA των ιχθυηρών που αναφέρονται στο κεφάλαιο «Μέθοδοι και υλικά». Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες των Min Sun, Chengzhu Liang, Hongwei Gao, Chao Lin, και Mingjun Deng, στο άρθρο τους «Detection of Parvalbumin, a Common Fish Allergen Gene in Food, by Real-Time Polymerase Chain Reaction», με κάποιες αλλαγές. Τα αντιδραστήρια και η πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω.

Αντιδραστήρια

- Master Mix (2x) ABI Prism™, (KAPATaq HotStart DNA polymerase, KAPA PROBE FAST qPCR Buffer, dNTPs, MgCl₂, ROX), της KAPA BIOSYSTEMS
- Εκκινητής forward 5'-CAGGACAAGAGTGGCTTCAT-3'
- Εκκινητής reverse 5'-GAAGTTCTGCAGGAACAGCTT-3'
- Probe, επισημασμένος με reporter dye (FAM) στο 5' άκρο και με quencher dye minor groove binder (MGB) στο 3' άκρο, 100μM, της VBC BIOTECH
- H₂Odd, της Promega
- Ειδικά tubes των 200μl για το μηχάνημα και την REAL TIME PCR
- Πλαστικό σωλήνα 1,7 ml (τύπου eppendorf)
- Πιπέτες και tips
- Φυγόκεντρος
- Vortex
- Δείγματα DNA

Μέθοδος

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου απαιτούνται το DNA του εξεταζόμενου τροφίμου και το mix το οποίο αποτελείται από το Master mix, τους εκκινητές και τον Probe.

- Το mix 2x που χρησιμοποιήθηκε περιείχε ποσότητα από το master mix 12,5μL, τους εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0,8μM και τον Probe σε τελική συγκέντρωση 0,4μM. Οι συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν για τελικό όγκο 25μL.

Πίνακας 2: Οι ακολουθίες βάσεων, η θερμοκρασία τήξης και το μέγεθος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήριο	Αλληλουχία 5' → 3'
Forward	5'-CAGGACAAGAGTGGCTTCAT-3'
Reverse	5'-GAAGTTCTGCAGGAACAGCTT-3'
Probe	5'-AGGAGGAYGAGCT-3' (Y για T ή G)

- Για την παρασκευή του mix υπολογίστηκαν οι ποσότητες των διαφόρων συστατικών του ώστε να έχουν την τελική επιθυμητή συγκέντρωση.

Πίνακας 3: Τελικές συγκεντρώσεις συστατικών αντίδρασης Real Time PCR

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μL) (Συγκέντρωση)	Τελική συγκέντρωση (στα 25μl)
Master Mix	12,5μL (2x)	1x
Εκκινητής forward	1,0 μL (20,0μM)	0,8 μM
Εκκινητής reverse	1,0 μL (20,0μM)	0,8 μM
TaqMan Probe	1,0 μL (10,0μM)	0,4 μM

- Για τον έλεγχο της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν control δείγματα, εκ των οποίων δύο ήταν θετικά και δύο αρνητικά. Τα δύο θετικά δείγματα εκτός από το mix

περιείχαν DNA από το πρότυπο (θετικό) δείγμα, ενώ τα αρνητικά στην θέση του DNA περιείχαν νερό.

- Για την μία αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν : 12,5μl Master mix, 1,0μl από τον κάθε εκκινητή 0,8μM , 1,0μl Probe 0,4μM και 8,0μl DNA για κάθε δείγμα. Για την επίτευξη της REAL TIME PCR, δημιουργήθηκε ένα αρχικό ολικό mix για το πλήθος των επιθυμητών αντιδράσεων, το οποίο περιείχε όλα τα συστατικά εκτός από το DNA.
- Σε έναν πλαστικό σωλήνα του 1,7ml (τύπου eppendorf) αναμείχθηκαν η ποσότητα του Master Mix, ο ευθύς και ο αντίστροφος εκκινητής , η ποσότητα του Probe για το πλήθος των επιθυμητών αντιδράσεων και ο σωλήνας ανακινήθηκε καλά. Από το mix αυτό, αντιστοιχούν 15,5μl για κάθε αντίδραση.
- Το περιεχόμενο του πλαστικού σωλήνα, μοιράστηκε στους ειδικούς για το μηχάνημα πλαστικούς σωλήνες (15,5μl ανά σωλήνα).
- Έπειτα στον κάθε σωλήνα προστέθηκε το αντίστοιχο DNA σε ποσότητα 8,0μL.
- Οι ειδικοί αυτοί σωλήνες, οδηγήθηκαν και τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα της Real Time PCR.
- Ακολούθως, ρυθμίστηκε το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για 43 κύκλους

Stage1	95,0 °C	2:00min	x1 κύκλο
Stage 2	95,0 °C	0:20min	x40 κύκλους
Stage 3	55,0 °C	0:20min	x1 κύκλο
Stage 4	72,0 °C	0:30min	x1 κύκλο

Παρατήρηση

Η προετοιμασία της αντίδρασης Real Time PCR πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες στον θάλαμο νηματικής ροής για αποφυγή επιμολύνσεων. Η προσθήκη του DNA πραγματοποιήθηκε σε ξεχωριστό χώρο, κατάλληλο για αυτήν την διαδικασία.

10.5 ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ

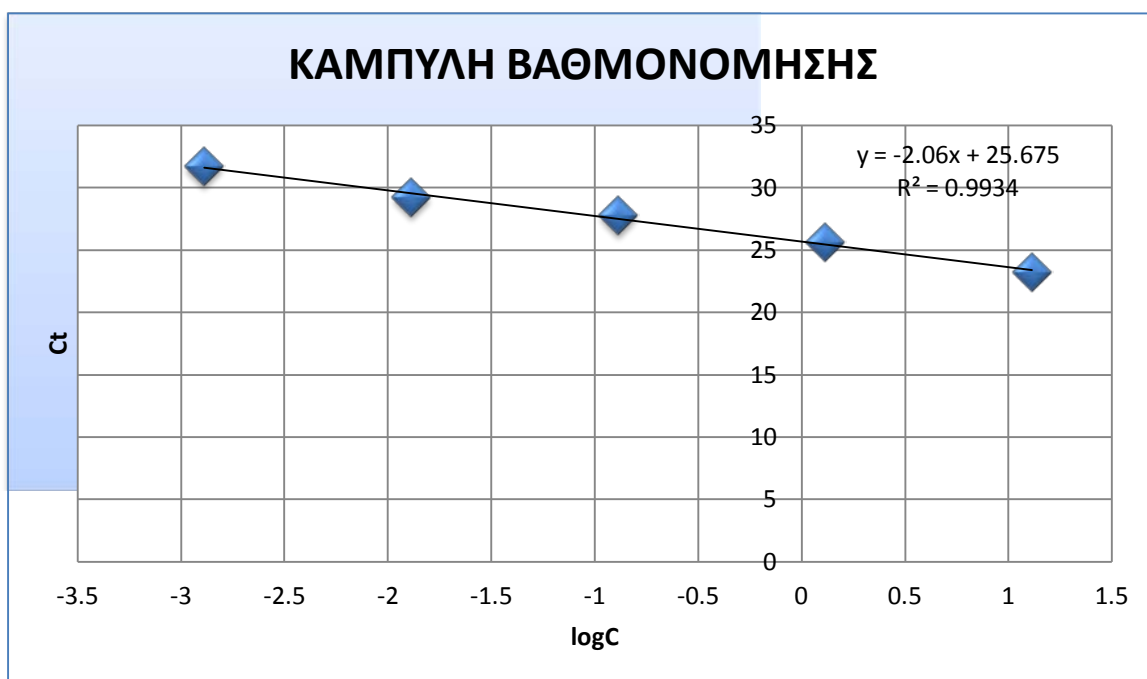
Αντιδραστήρια-Εξοπλισμός:

- DNA πρότυπου δείγματος
- Υλικά που απαιτούνται για αντίδραση Real Time PCR
- Epoch. Microplate Φασματοφωτόμετρο (λογισμικό Gen 5 Data Analysis Software).

Μέθοδος:

- Για την πραγματοποίηση της ποσοτικοποίησης ήταν αναγκαία η δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης.
- Ως πρότυπο δείγμα χρησιμοποιήθηκε DNA το οποίο είχε απομονωθεί με χρήση του kit NucleoSpin Food Geonomic DNA from Food της MACHERY-NAGEL.
- Η συγκέντρωση του προτύπου δείγματος βρέθηκε να είναι 13ng/μl με την βοήθεια του φασματοφωτομέτρου Epoch Microplate.
- Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις του προτύπου δείγματος σε 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .
- Το πρότυπο διάλυμα και οι πέντε διαδοχικές αραιώσεις οδηγήθηκαν σε Real Time PCR όπως αναφέρεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο.
- Τα δείγματα μπήκαν σε επανάληψη και χρησιμοποιήθηκε ένας αρνητικός μάρτυρας.

- Μετά το πέρας της αντίδρασης δημιουργήθηκε η καμπύλη βαθμο ώμησης και βρέθηκε ο τύπος της συνάρτησης που την εκφράζει.
- Με την βοήθεια της καμπύλης βαθμονόμησης και της εξίσωσής της, υπολογίστηκε η ποσότητα DNA που περιείχαν τα εξετασθέντα ιχθυηρά.
- Στην Εικόνα 23 παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης (standard curve) σύμφωνα με την οποία υπολογίστηκε η ποσότητα των αντιγράφων σε κάθε δείγμα μετά το τέλος της αντίδρασης. Πάνω στην καμπύλη βαθμονόμησης, εμφανίζονται τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων του DNA (άξονας y) που έχει το κάθε δείγμα και ανάλογα με τον κύκλο (άξονας x) που μετρήθηκε η ποσότητα.



Εικόνα 23: Καμπύλη Βαθμονόμησης-Ποσοτικοποίησης

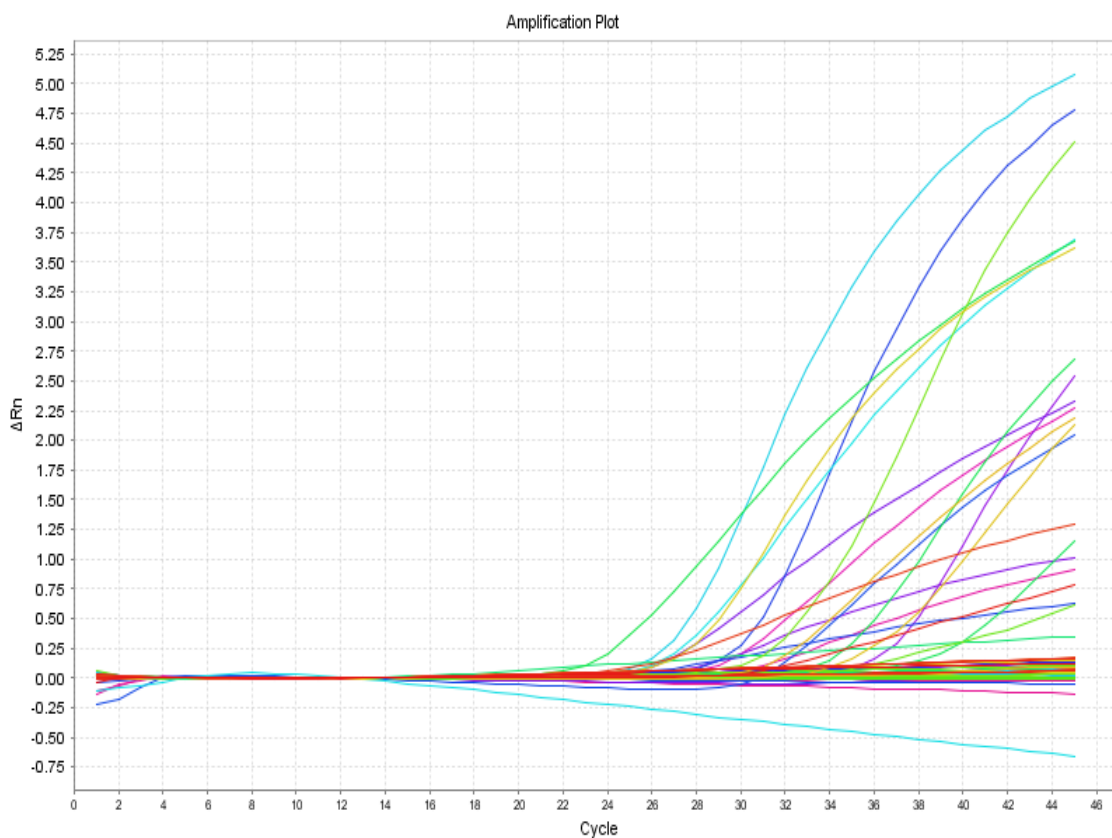
- Με την βοήθεια της καμπύλης βαθμονόμησης και της εξίσωσής της, υπολογίστηκε η ποσότητα DNA παρβαλβουμίνης που περιείχαν τα εξετασθέντα τρόφιμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

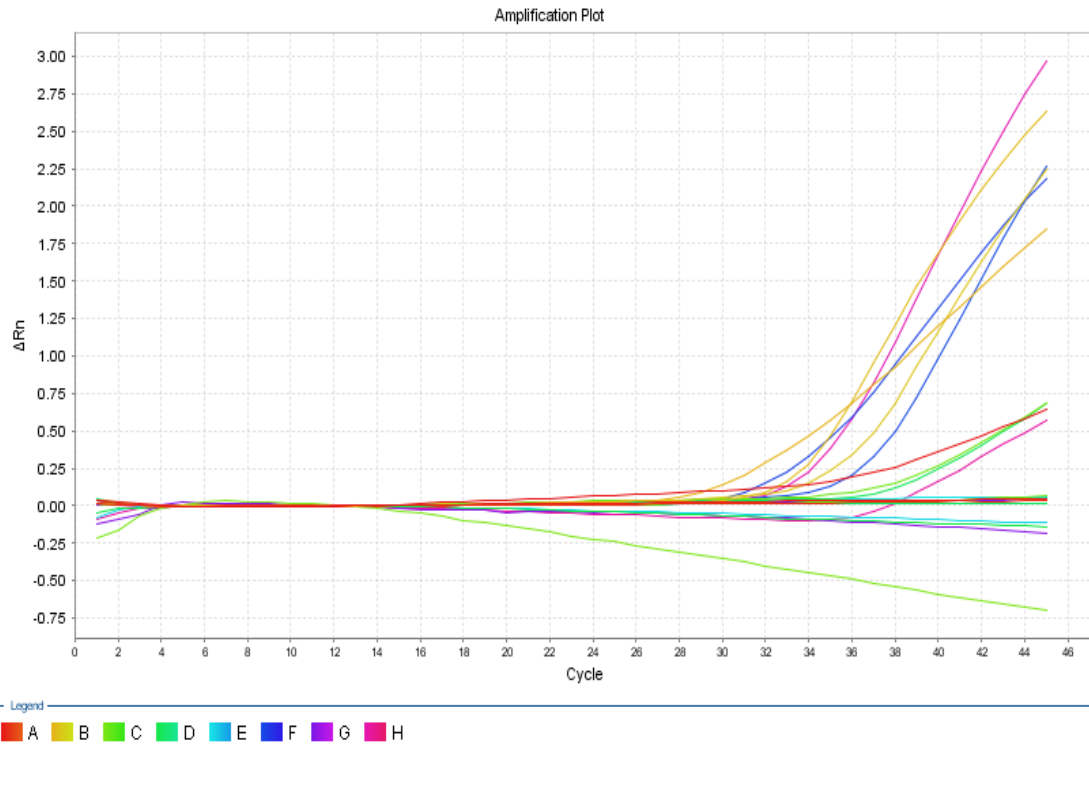
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

11.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ REAL TIME PCR

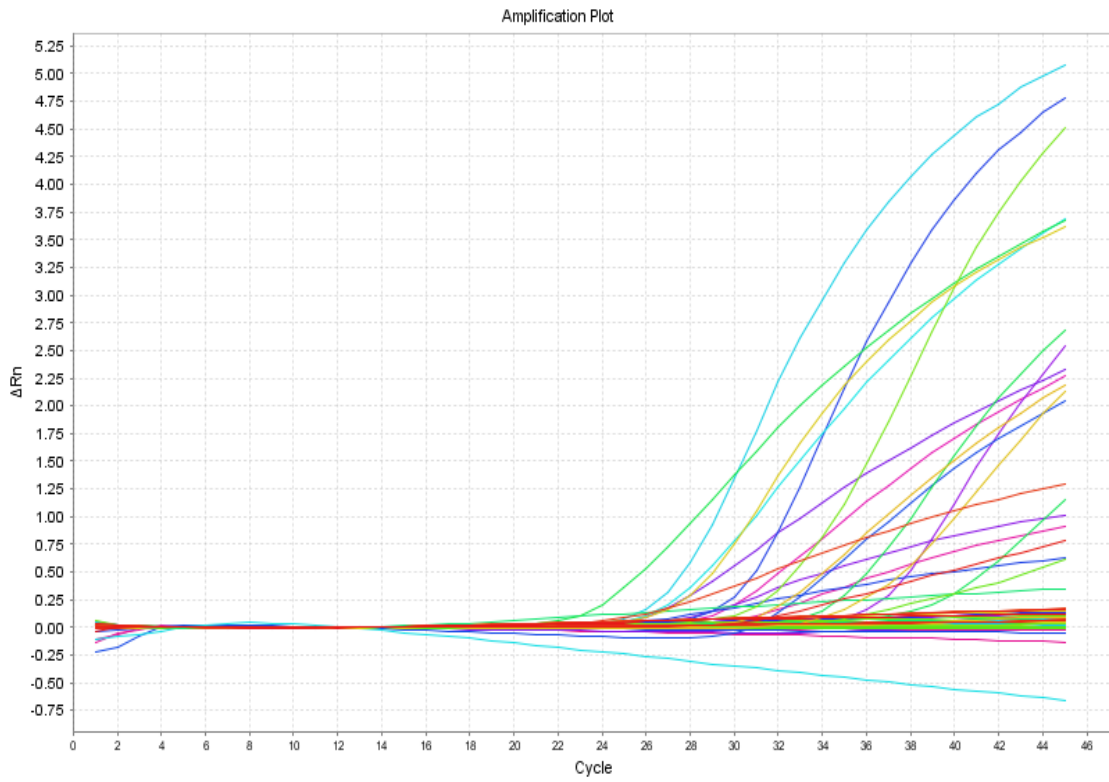
Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα αποθέματα της αντίδρασης Real Time PCR καταγράφονται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μετρώντας την μεταβολή του φθορισμού και τα αποτελέσματα απεικονίζονται με τη μορφή εκθετικής καμπύλης παρουσιάζοντας έτσι την ανάλογη αύξηση των προϊόντων. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα τελικά αποτελέσματα της αντίδρασης με την μορφή καμπυλών.



Εικόνα 24: Καμπύλες αντίδρασης Real Time PCR των δειγμάτων DNA των ιχθυηρών που εξετάστηκαν



Εικόνα 25: Καμπύλες αντίδρασης Real Time PCR των δειγμάτων DNA των ιχθυηρών που εξετάστηκαν



Εικόνα 26: Καμπύλες αντίδρασης Real Time PCR των δειγμάτων DNA των ιχθυηρών που εξετάστηκαν

Τα αποτελέσματα που αντιστοιχούν στα ανωτέρω διαγράμματα είναι:

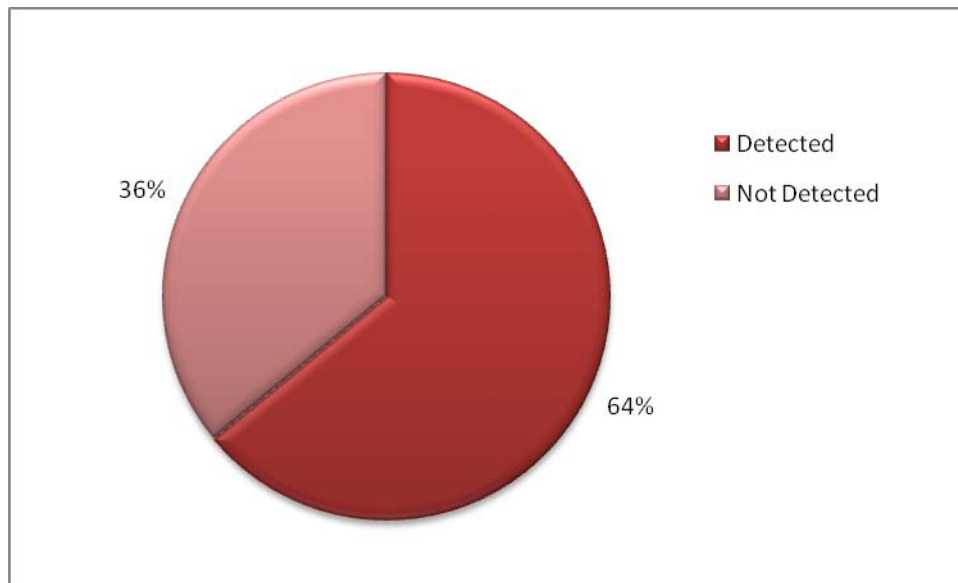
N_o	ΚΟΙΝΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ Real Time PCR	Mean Ct	DNA yield (ng/100mg fish)
1	Γάυρος	+	28.12±0.05	0.083
2	Κολιός	+	27.05±0.04	0.13
3	Σαυρίδι	+	31.25±0.06	0.0013
4	Σαργός	+	31.12±0.05	0.0013
5	Μπαρμπούνι 1	+	29.12±0.05	0.013
6	Μαρίδα	+	32.12±0.05	0.001
7	Λυθρίνι	+	26.08±0.08	0.6
8	Μελανούρι	+	32.12±0.09	0.001
9	Τσιπούρα	+	23.15±0.04	>13
10	Φαγκρί	+	27.12±0.05	0.13
11	Λαβράκι	+	29.12±0.05	0,013
12	Σουπιά	+	30.09±0.04	0.0053
13	Σαρδέλα	+	26.05±0.04	0.6
14	Μοσχογτάποδο	+	31.12±0.08	0.0013
15	Μπαρμπούνι 2	+	27.05±0.07	0.13
16	Σουπιά 2	+	31.09±0.04	0.0013

17	Ρόδινη γαρίδα 1	-	Not detected	Not detected
18	Σκουμπρί	-	Not detected	Not detected
19	Χταπόδι	-	Not detected	Not detected
20	Κυδώνι	-	Not detected	Not detected
21	Καλαμάρι	-	Not detected	Not detected
22	Ρόδινη γαρίδα 2	-	Not detected	Not detected
23	Καραβίδα	-	Not detected	Not detected
24	Γυαλιστερή	-	Not detected	Not detected
25	Μύδι Μεσογείου	-	Not detected	Not detected

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων

Τα θετικά δείγματα είναι ο γαύρος, η σουπιά, η σαρδέλα και η αραίωση τους 10^{-1} επίσης η γαρίδα σε αραίωση 10^{-1} , η τσιπούρα, το φαγκρί, το λαβράκι, το προσφυγάκι, το μπαρμπούνη καθώς και οι αραιώσεις τους 10^{-1} και 10^{-2} . Το μοσχοχτάποδο βρέθηκε θετικό μόνο όταν εξετάστηκε σε αραίωση 10^{-2} . Τα περισσότερα δείγματα βρέθηκαν θετικά μετά από αραίωση του DNA. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στη μεγάλη συγκέντρωση του απομονωθέντος DNA, είτε στην πιθανή παρουσία αναστολέων στα δείγματα αυτά.

Ο αριθμός των κύκλων σχετίζεται με την ποσότητα των αντιγράφων του γονιδίου της παρβαλβουμίνης. Όσο μικρότερος ήταν ο αριθμός των κύκλων τόσο περισσότερα αντίγραφα του γονιδίου της παρβαλβουμίνης εντοπίζονται.



Εικόνα 25: Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού θετικών/αρνητικών αποτελεσμάτων

Στο γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό των θετικών και των αρνητικών αποτελεσμάτων. Αναλυτικότερα, από το σύνολο των 25 δειγμάτων που εξετάστηκαν, το 64% ήταν θετικά στην ύπαρξη του γονιδίου της παρβαλβουμίνης, ενώ στο 36% δεν ανιχνεύθηκε το γονίδιο. Συγκεκριμένα, τα 16 από τα 25 δείγματα περιείχαν παρβαλβουμίνη. Στα υπόλοιπα 9 δείγματα δεν παρατηρήθηκε ανίχνευση του γονιδίου.

Από τα 25 δείγματα που μελετήθηκαν, ορισμένα από αυτά ανήκουν στα μαλάκια. Στην κατηγορία αυτή, περιέχονται τα δίθυρα και τα κεφαλόποδα. Ειδικότερα, 6 εκ του συνόλου δείγματα, ανήκουν στα μαλάκια. Στα δίθυρα κατατάσσονται τα δείγματα: μύδι, κυδώνι, γυαλιστερή και στα κεφαλόποδα τα δείγματα: σουπιά, μοσχοχτάποδο, χταπόδι, καλαμάρι. Συμπερασματικά, όπως διαπιστώνεται από τις καμπύλες αντίδρασης της Real Time PCR και από τον πίνακα των αποτελεσμάτων, όλα τα δείγματα που ανήκουν στα δίθυρα, δηλαδή το μύδι, το κυδώνι και η γυαλιστερή, είναι αρνητικά στην ανίχνευση της παρβαλβουμίνης. Αντίθετα, τα δείγματα που κατατάσσονται στα κεφαλόποδα, είναι κατά αναλογία θετικά σε ποσοστό 50% (2/4 δείγματα). Διακρίνεται επομένως ότι από τα κεφαλόποδα, η σουπιά και το μοσχοχτάποδο ήταν θετικά στην ανίχνευση της παρβαλβουμίνης αλλά το χταπόδι και το καλαμάρι ήταν αρνητικά.

Όσον αφορά τα δείγματα γαρίδα και καραβίδα, εντάσσονται στα μαλακόστρακα τα οποία ανήκουν στο φύλο των αρθρόποδων και στην κλάση των καρκινοειδών. Τα αποτελέσματα αυτών ήταν αρνητικά στην ανίχνευση της παρβαλβουμίνης με μοναδική εξαίρεση, όπως φαίνεται στις καμπύλες αντίδρασης της Real Time PCR, τη μη αραιωμένη γαρίδα που ίσως προέκυψε θετική λόγω ενδεχομένου σφάλματος (αναστολείς της αντίδρασης της Real Time PCR, αυξημένη ποσότητα DNA, σφάλματα στο χειρισμό κλπ). Κατά γενική ομολογία, η γαρίδα προκύπτει να είναι αρνητική στην παρβαλβουμίνη, αφού σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το κύριο αλλεργιογόνο της είναι η τροπομυοσίνη.

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί ανάλογα με τον τρόπο ζωής τους μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλα οικοσυστήματα: το πελαγικό και το βενθικό. Από τα συλλεχθέντα δείγματα στο πελαγικό οικοσύστημα ανήκουν πέντε: ο γαύρος, ο κολιός, το σαυρίδι, η σαρδέλα και το σκουμπρί. Στο βενθικό οικοσύστημα ανήκουν εννέα δείγματα: ο σαργός, το μπαρμπούνη, η μαρίδα, το λυθρίνη, το μελανούρι, η τσιπούρα, το φαγκρί και το λαβράκι. Από το σύνολο των 14 αυτών δειγμάτων όλα ήταν θετικά στην ανίχνευση παρβαλβουμίνης εκτός από το σκουμπρί. Αναλυτικότερα, στα πελαγικά δείγματα, τα θετικά κατά αναλογία είναι 4/5 και είναι ο γαύρος, ο κολιός, το σαυρίδι και η σαρδέλα με εξαίρεση το σκουμπρί. Όσο για τα βενθικά ψάρια, προέκυψαν όλα θετικά (ο σαργός, το μπαρμπούνη, η μαρίδα, το λυθρίνη, το μελανούρι, η τσιπούρα, το φαγκρί και το λαβράκι), δηλαδή 9/9 δείγματα.

Όπως παρατηρείται επομένως όλα τα βενθικά ψάρια που ανήκουν στα παραπάνω δείγματα μπορούν να προκαλέσουν αλλεργία στα ευαίσθητοποιημένα άτομα αφού όλα εκφράζουν το αλλεργιογόνο γονίδιο της παρβαλβουμίνης. Επίσης τα πελαγικά ψάρια διαπιστώνεται ότι είναι ως επί το πλείστον θετικά εφόσον μόνο ένα από τα πέντε είναι αρνητικό. Άρα, με βάση τη δειγματοληψία της παρούσας πτυχιακής εργασίας τόσο τα βενθικά όσο και τα πελαγικά ψάρια εκφράζουν σε μεγάλη αναλογία το αλλεργιογόνο γονίδιο, θέτοντας σε κίνδυνο τα αλλεργικά άτομα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο αριθμός των συγκεκριμένων δειγμάτων δεν επαρκεί ώστε να οδηγηθούμε σε ένα γενικό συμπέρασμα με ακρίβεια, λόγω μικρής επαναληψιμότητας, οπότε απαιτείται περαιτέρω έρευνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με όσα έχουν προαναφερθεί, στόχος της παρούσας πειραματικής πτυχιακής εργασίας ήταν η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός πιθανών αλλεργιογόνων ιχθυηρών σε φρέσκα αλιεύματα της Μεσογείου μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) ώστε να διαπιστωθεί αν αντιστοιχούν στα εν λόγω δείγματα. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού αρχικά απομονώθηκε με επιτυχία το DNA από κάθε ιχθυηρό μέσω διαφόρων τεχνικών απομόνωσης και εξακριβώθηκε η ύπαρξή του με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης ήταν ένα σημαντικό μέσο για την ποιοτική διαπίστωση της επιτυχούς απομονώσεως και παρουσίας του DNA στα δείγματα που εξετάστηκαν. Τα δείγματα DNA των εξεταζόμενων ιχθυηρών οδηγήθηκαν σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του αλλεργιογόνου γονιδίου της παρβαλβουμίνης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν (forward, reverse) αποδείχθηκαν να είναι κατάλληλοι για την ανίχνευση του συγκεκριμένου αλλεργιογόνου. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν έπειτα από την έρευνά τους οι Min Sun, Chengzhu Liang, Hongwei Gao, Chao Lin, and Mingjun Deng. Τα αποτελέσματα από την Real Time PCR κατά το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν αναμενόμενα.

Συνολικά, συλλέχθηκαν από την αγορά 25 είδη ψαριών, μαλακίων και μαλακοστράκων που συνήθως καταναλώνονται στην περιοχή της Μεσογείου. Από τα 25 δείγματα, τα 16 (64%) που εξετάστηκαν έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Τα θετικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών (σκουμπρί, σαυρίδι, σαργός, μπαρμπούνη, αθερίνα, λυθρίνη, μελανούρι, τσιπούρα, φαγκρί, λαβράκι, προσφυγάκι, γαύρος, σαρδέλα) και των κεφαλόποδων (σουπιά, μοσχοχτάποδο) επέδειξαν σε μεγάλο βαθμό μεταβλητά όρια, με διαφορά 12 κύκλων, παρόλο που χρησιμοποιήθηκαν ίσες ποσότητες DNA στην εφαρμογή της μεθόδου PCR. Η τσιπούρα (*Sparus aurata*), η σαρδέλα (*Sardina pilhardus*) και το μπαρμπούνη (*Mullus surmuletus*) έδωσαν το μικρότερο μέσο όριο (Ct) με τιμή 23.00, ενώ η μαρίδα (*Spicara smaris*) και το μελανούρι (*Oblada melanura*) έδωσαν την υψηλότερη μέση τιμή Ct (35,00), υποδεικνύοντας ότι ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου παρβαλβουμίνης

ποικίλλει στα διάφορα είδη ιχθυηρών. Όταν εξετάστηκαν τα αραιωμένα δείγματα, 10 περιπτώσεις αναστολής εντοπίστηκαν.

Πιθανό αίτιο της αδυναμίας ανίχνευσης της παρβαλβουμίνης στα χωρίς αραιώση δείγματα μπορεί να είναι η ύπαρξη αναστολέων ή η μεγάλη ποσότητα DNA στα δείγματα αυτά.

Μελέτες για την αλλεργία στα οστρακοειδή αναφέρουν ότι η τροπομυοσίνη είναι ένα κύριο αλλεργιογόνο με μια σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ των αλλεργιογόνων στα μαλακόστρακα και μαλάκια, ενώ αποδεικνύεται ότι αυτά περιέχουν επιπρόσθετα ανά περιπτώσεις την παρβαλβουμίνη. Τα τελευταία χρόνια, η τροπομυοσίνη έχει αποδειχθεί ότι είναι μια σημαντική αλλεργιογόνος ουσία για διάφορα οστρακοειδή, συμπεριλαμβανομένων τις γαρίδες, τον αστακό, το καβούρι, τα καλαμάρια, τα στρείδια και τα χταπόδια.

Τα πλεονέκτημα της Real Time PCR είναι ο μικρός χρόνος που απαιτείται για την αντίδραση με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα εξαιτίας του αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης, η αποφυγή επιμολύνσεων, λόγω της εκτέλεσης της αντίδρασης σε ένα κλειστό υψηλής τεχνολογίας σύστημα ώστε να μην απαιτούνται χειρισμοί μετά την PCR για την ανάλυση του προϊόντος και να ελαχιστοποιούνται έτσι οι επιμολύνσεις στο εργαστήριο και τέλος η δυνατότητα ποσοτικοποίησης.

Με βάση βιβλιογραφικές αναφορές βρέθηκε ότι υπάρχει ένα ευρύ φάσμα των ερευνητικών εργαλείων που παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία για την ανίχνευση αλλεργιογόνων σε τρόφιμα. Οι περισσότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται, συχνά χρησιμοποιούν τεχνικές που βασίζονται στη Real Time PCR. Η τεχνολογία της RT-PCR έχει αξιολογηθεί εκτεταμένα στα τροφικά αλλεργιογόνα. Πιο συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί για την άμεση ανίχνευση των αλλεργιογόνων ουσιών στα τρόφιμα, χρησιμοποιώντας τεχνολογίες όπως SYBR Green, και υδρόλυση με ανιχνευτές TaqMan. Αυτό αποδείχθηκε και στην παρούσα πειραματική πτυχιακή εργασία η οποία επιτεύχθηκε με την εν λόγω μέθοδο.

Ενιαίες γραμμές παραγωγής για πολλά προϊόντα μπορούν να προκαλέσουν διασταυρούμενη επιμόλυνση των παραγωγικών γραμμών, ιδιαίτερα από τα τροφικά αλλεργιογόνα. Επιπλέον, οι πρώτες ύλες μπορεί να είναι σύνθετα προϊόντα που

περιέχουν συστατικά που δεν αναγράφονται. Ως εκ τούτου, η διαχείριση των αλλεργιογόνων συνίσταται να αντιμετωπίσει δύο σημεία:

A) τον προσδιορισμό των αλλεργιογόνων ή παραγώγων αυτών στις πρώτες ύλες που παραλαμβάνονται από τον προμηθευτή και προστέθηκαν σκόπιμα και

B) την παρουσία οποιουδήποτε αλλεργιογόνου που προέρχεται από τη μόλυνση στους χώρους προμηθειών με την εκτίμηση του κινδύνου διασταυρούμενης επιμόλυνσης σε επίπεδο εγκαταστάσεων (π.χ., γραμμές παραγωγής, μηχανήματα, κ.λπ.) ή από τη ρύπανση του περιβάλλοντος χρησιμοποιώντας τολύπια για να παρακολουθείται ο καθαρισμός και να γίνεται η ανίχνευση των αλλεργιογόνων στις επιφάνειες και στον εξοπλισμό.

Η συμμόρφωση με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία για την επισήμανση αλλεργιογόνων (Οδηγία 2007/68/EK), είναι δυνατή μόνο όταν συνδυάζεται με τις κατάλληλες μεθόδους για την ανίχνευση αλλεργιογόνων ουσιών σε τρόφιμα. Πράγματι η μέθοδος Real Time PCR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη αποδείχθηκε κατάλληλη για την ανίχνευση αλλεργιογόνου ουσίας στα τρόφιμα και κυρίως των ιχθυηρών.

Η μέθοδος αυτή είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση θεμάτων σχετικά με την ποιότητα των τροφίμων και την ασφάλειά τους και προσφέρεται για την επαλήθευση της εφαρμογής των κανονισμών σήμανσης καθώς και για την εξασφάλιση της προστασίας του καταναλωτή.

Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που δημοσιεύτηκαν μέχρι τώρα, ανεξάρτητα από το αν βασίζονταν σε πρωτεϊνική ή σε DNA μέθοδο για την ανίχνευση αλλεργιογόνων υπολειμμάτων ψαριών, είχαν μια παρόμοια έλλειψη, η οποία εκφράζει την ανικανότητα των υφιστάμενων μεθόδων στην ανίχνευση των άγνωστων καταλοίπων ψαριών που προέρχονται από όλα τα είδη των ιχθυηρών σε τρόφιμα. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη των ευρύτερων μεθόδων για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα ψάρια παραμένει ένας χώρος για περισσότερη έρευνα και βελτίωση.

Συμπερασματικά μέσω της Real Time PCR είναι εφικτή η ανίχνευση αλλεργιογόνου ουσίας παρβαλβουμίνης στα ιχθυηρά της Μεσογείου ακόμα και σε μικρή ποσότητα, κάτι που είναι πολύ σημαντικό για τα αλλεργικά άτομα αφού ακόμα και ίχνη μπορούν να επιφέρουν αλλεργικές αντιδράσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

13.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αργύρης Π. Ιωάννης, 1992 Ανοσοβιολογία, Θεσσαλονίκη

Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης, 2009. Υπουργείου Οικονομικών-Γενικό Χημείο Κράτους Εθνικό Τυπογραφείο.

ΛΑΖΑΝΑΚΗ ΒΙΡΓΙΝΙΑ 2010. Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ REAL TIME PCR (RT- PCR) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ (Escherichia coli). Σελ. 9-23.

Μπατρίνου Ανθιμία, 1998. Γονιδιακή Θεραπεία, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, Αθήνα.

13.2 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bugajska-Schretter, A., Elfman L., Fuchs T., Kariotis S., Rumpold H., Valenta R. and Spitzauer S. (1998). "Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca²⁺ depletion. *J Allergy Clin Immunol* 101(1), 67-74.

Chen, L., Hefle S. L, Taylor S. L., Swoboda I., and Goodman R. E. (2006). Detecting fish parvalbumin with commercial mouse monoclonal anti-frog parvalbumin IgG. *J Agric Food Chem.* 54, 5577–5582.

Choi, K. Y. and Hong K. W. (2007). Genomic DNA sequence of mackerel parvalbumin and a PCR test for rapid detection of allergenic mackerel ingredients in food. *Food Sci Biotechnol.* 16, 67–70.

de Martino, M., Novembre E., Galli L, De Marco A., Botarelli P., Marano E., Vierucci A. (1990). Allergy to different fish species in cod-allergic children: in vivo and in vitro studies. *J Allergy Clin Immunol* 86(6), 909-914.

- Elsayed, S. and Bennich H. (1975). The primary structure of allergen M from cod. *Scand J Immunol* 4(2), 203-8.
- Faeste, C. K. and C. Plassen (2008). "Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. *J Immunol Methods* 329(1-2), 45-55.
- Gajewski, K. G. and Hsieh, Y. H. (2009). Monoclonal antibody specific to a major fish allergen: Parvalbumin. *Journal of Food Protection*, 72(4), 818–825.
- Griesmeier U., Vázquez-Cortés S., Bublin M., Radauer C., Ma Y., Briza P, Fernández-Rivas M .and. Breiteneder Griesmeier H. (2010). Expression levels of parvalbumins determine allergenicity of fish species. *Allergy* 65(2), 191–198.
- Hamada Y., Tanaka H. and Ischizaki S. (2003). Purification, reactivity with IgE and cDNA cloning of parvalbumin as the major allergens of mackerels. *Food and Chemical Toxicology* 41 (8), 1149-1156.
- Hildebrandt, S., and Garber, E. A. E. (2010). Effects of processing on detection and quantification of the parvalbumin gene in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Chemistry*, 119, 75–80.
- Hilger C., Thill L., Grigioni F., Lehnert C., Falagiani P., Ferrara A., Romano C., Stevens W .and Hentges Hilger F. (2004). IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin. *Allergy* 59(6), 653–660.
- Kobayashi A. Tanaka H., Hamada Y., Ishizaki SY., Nagashima and K. Shiomi (2006). Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy* 61 (3), 357–363.
- Lehrer S. B., Horner W. E., Reese G. (1996). "Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev Food Sci Nutr* 36(6), 553-64.
- Li, Z., Zhang, Y., Pawar, R., Wang, G., and Lin, H. (2011). Development of an optimized protein chip for the detection of fish parvalbumin allergen. *Current Analytical Chemistry*, 7(4), 349–356.

Shibahara Y., Uesaka Y., Wang J., Yamada S., Shiomi K. (2013). A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fish protein in processed foods. *Food Chemistry* 136, 675–681.

Shiomi K., Hamada Y., Sekiguchi K., Shimakura K. and Nagashima Y. (1999). Two classes of allergens parvalbumins and higher molecular weight substances, in Japanese eel and bigeye tuna. *Fish Sci* 65(6), 943-948.

Sun, M., Liang C., Gao H., Lin C, and Deng M. (2009). Detection of parvalbumin, a common fish allergen gene in food, by real-time polymerase chain reaction. *J AOAC Int.* 92, 234–240.

Applied Biosystems, χωρίς χρονολογία (XX). “Real Time PCR vs Traditional PCR”. Applied Biosystems. Σελ.1-15.

Bio-rad (2010) “Real Time PCR Chemistries”, Bio-Rad Laboratories, Inc.

Burney P., Keil T., Grabenhenrich L. and Wong G., 2014. Chapter three – The Epidemiology of Food Allergy, in Risk Management for Food Allergy, Σελ. 45-64.

Carina Venter, PhD, RD, S. Hasan Arshad, DM, FRCP , “Epidemiology of Food Allergy”.

Davidson, 2002. “Nested PCR”. Davidson College, Davidson.

Dean D. Metcalfe, Hugh A. Sampson, Ronald A. Simon (2008) Food Allergy: Adverse reactions to food and food additives, 4nd edition, Blackwell Science.

Deming Kong, Hanxi Shen, Yanping Huang & Huafeng Mi, 2003 PCR hot-start using duplex primers.

Dorak M.Tevfik, 2006. Real Time PCR, Advanced Methods, Newcastle University, Taylor & Francis Group.

Haqqi T M, Sarkar G, David C S, Sommer S S, 1988. Specific amplification with PCR of a refractory segment of genomic DNA.

Holgate S. T., Davies D. E., Lackie P. M., Wilson S. J., Puddicombe S. M. and Lordan J. L., 2000. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma in *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Σελ. 193-204.

Houghton S. and Cockerill F., 2006. “RealTime PCR: Overview and applications”. *Surgery*, Vol 139, No 1, Σελ. 1- 5.

Mullis K. B. and Faloona F. A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, in *Methods in Enzymology*, vol. 155 Σελ. 335-350.

Promega, 2009. “Protocols & Applications Guide”. Εκδόσεις Promega corporation, Έδρα Madison, USA. Κεφάλαιο 1: “PCR Applications”.

Sicherer S. H. and Sampson H. A., 2014. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment cohorts in *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol 133 Σελ. 291-307.

Stratagene, 2006. “Introduction to Quantitative PCR”. Stratagene, La Jolla, CA. Σελ. 3-8, 9-11, 23-26.

Goodman, M., and J. F. Pechère. The evolution of muscular parvalbumins investigated by the maximum parsimony method. *J Mol Evol.* 9:131-58.

Hilger, C., L. Thill, F. Grigioni, C. Lehnert, P. Falagiani, A. Ferrara, C. Romano, W. Stevens, and F. Hentges. 2004. IgE antibodies of fish allergic patients cross-react with frog parvalbumin. *Allergy* 59: 653-660.

Elsayed, S., and J. Apold. 1983. Immunochemical analysis of cod fish Allergen M: locations of the immunoglobulin binding sites as demonstrated by the native and synthetic peptides. *Allergy* 38: 449-459.

Fö hr, U. G., B. R. Weber, M. Müntener, W. Staudenmann, G. J. Hughes, S. Frutiger, et al. 1993. Human α and β parvalbumin: structure and tissue-specific expression. Eur. J. Biochem. 215: 719-727.

Yoshida, S., A. Ichimura, and K. Shiomi. 2008. Elucidation of a major IgE epitopes of Pacific mackerel parvalbumin. Food Chem. 111: 857-861.

13.3 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<http://www.allergy.org.gr>

<http://alloergo.yolasite.com/αλλεργιες.php>

<http://www.appliedbiosystems.com>

<http://www.chem.uoa.gr>

<http://www.fao.org>

<http://www.food.gov.uk/>

<http://www.sciencedirect.com/>

<http://www.fda.gov>

<http://www.efet.gr/alergiogona.html>

<http://eur-lex.europa.eu>,

<http://www.eufic.org>

www.allergia.gr

http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page