

Élelmiszer-allergének mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai módszerek alkalmazási környezetének fejlesztése

KORMOSNÉ BUGYI Zsuzsanna* és TÖMÖSKÖZI Sándor

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem,

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, Szent Gellért tér 4., 1111 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Az élelmiszerlánc biztonságának szavatolása során számos olyan tényező vizsgálata szükséges, melyek kockázatot jelentenek a fogyasztók számára. A „hagyományos”, főként külső forrásokból származó biológiai, kémiai és fizikai veszélyforrások mellett az utóbbi évtizedekben egyre növekvő egy olyan speciális élelmiszerbiztonsági terület jelentősége, melynél a veszély forrásai az élelmiszerek olyan természetes alkotói, elsősorban fehérjéi, melyek túlérzékenységi reakciókat (pl. allergia, intolerancia) válthatnak ki az emberi szervezetben. A különböző típusú rendellenességek eltérő mechanizmussal rendelkeznek, jelenleg egyetlen hatékony kezelési módjuk a kiváltó fehérjéket elhagyó diéta alkalmazása.¹⁻²

Az érintett fogyasztók biztonságos élelmiszer-alapanyagokkal és -termékekkel történő ellátásában az érintett szektor minden szereplőjének (a fogyasztóknak, a klinikumnak, az élelmiszergyártóknak, az analitikai módszerfejlesztőknek, a vizsgáló laboratóriumoknak és a hatóságnak) együtt kell működnie. A jelentkező igen összetett problémákör megoldása csak több tudományterület szoros együttműködésével lehetséges. A klinikai kutatásoknak minél pontosabban meg kell határozniuk a túlérzékenységi reakciók mechanizmusát, azonosítaniuk kell a kiváltó fehérjemolekulákat és –epitópokat, valamint a tüneteket kiváltó küszöbdózisokat.

Emellett szükség van a kiváltó molekulák és epitópok minél szélesebb körű fehérjekémiai vizsgálatára, valamint az élelmiszer-előállítás során alkalmazott fizikai-kémiai műveletek fehérjeszerkezetre, funkcionális tulajdonságokra (pl. oldhatóság) és biológiai aktivitásra (pl. immunaktivitás) gyakorolt hatásainak megértésére.

Ezek az információk elengedhetetlenek a területhez kapcsolódó szabályozási környezet kialakításához. Az élelmiszerek megfelelő ellenőrzéséhez olyan analitikai módszertan létrehozására van szükség, mely képes a tüneteket kiváltó komponensek megbízható meghatározására. A validált, megbízható analitikai módszertan mindenképpen szükséges a gyártásközi- és termékellenőrzéshez, az élelmiszerbiztonsági és allergénmenedzsment rendszerek működtetéséhez, a fogyasztók megbízható informálásához.³⁻⁴

Az allergének meghatározása többféle módszerrel lehetséges, jelenleg rutinszerűen a viszonylag egyszerűen kivitelezhető és specifikus immunanalitikai elven működő

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) módszerek terjedtek el. Az ELISA módszertan alkalmazhatósága azonban korlátozott, melynek egyik oka, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható kitek érvényesítése akadályokba ütközik. Ez részben a validálás alapját képező referencia anyagok és referencia módszerek hiányával, részben egyéb tényezőkkel magyarázható.

Utóbbiak közül érdemes kiemelni a tünetekért felelős fehérjék sokféleségét és genetikai-környezeti változékonyságát, a küszöbdózisokról és kiváltó élelmiszer-összetevők molekuláris jellemzőiről rendelkezésre álló ismeretek elégtelenségét, valamint az élelmiszer-feldolgozási folyamatok kiváltó molekulákra gyakorolt hatásait leíró adatok hiányosságait. Ezeket a tényezőket figyelembe kell venni az analitikai módszerfejlesztés, valamint a módszervalidáláshoz szükséges referencia anyagok fejlesztése során is.⁵⁻⁹

A probléma megoldásán számos nemzetközi kutatócsoport dolgozik. A munkában Tanszékünk is részt vesz az Európai Unió 6. Keretprogramja által támogatott MoniQA (Monitoring and Quality Assurance in the Food Supply Chain) Kiválóságághálózat Allergén Munkacsoportjának tagjaként. A Munkacsoport tevékenységéhez is kapcsolódóan a jelen közleményben bemutatott doktori értekezés alapjául szolgáló kutatómunka fő célkitűzései a következők voltak:

- Olyan új referencia anyagok fejlesztése, melyek három gyakori allergén, a tej, tojás és glutén fehérjéit feldolgozott, reális élelmiszer-mátrixban tartalmazzák.
- A fejlesztett referencia anyagok segítségével a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA módszerek teljesítményjellemzőinek meghatározása, összehasonlító elemzése és az eredmények mögött álló jelenségek értelmezése. Ilyen irányú vizsgálataink újszerűsége, hogy az elsők között végeztük el azokat reális élelmiszer-mátrixot modellező referencia anyagok felhasználásával. Ezzel az eddigieknél jobban definiált körülmények között nyílt lehetőség a módszervalidálás kivitelezésére és az analitikai eredményeket befolyásoló jelenségek tanulmányozására.
- A feldolgozási folyamaton átesett fehérjék meghatározásakor kapott analitikai adatok összevetése a natív állapotban lévő fehérjék által szolgáltatott eredményekkel, így módon becsülve és értékelve a feldolgozási folyamatok által okozott analitikai bizonytalanság mértékét, valamint az ennek hátterében álló fehérjeszintű változásokat.

* Tel.: +36-1/463-3865; fax: +36-1/463-3855; e-mail: bugyi@mail.bme.hu

2. Eredmények

2.1. A tej- és tojásfehérjét, valamint gliadint tartalmazó referencia anyagok fejlesztése

Mivel olyan mintamátrix létrehozását láttuk célszerűnek, mely bármely allergén komponens esetében univerzálisan alkalmazható a referencia anyag fejlesztés alapanyagaként, elsőként a 4. fejezetben bemutatott irodalmi recept (sütemény)¹⁰ módosítására volt szükség allergénmentes modelltermék előállítása céljából. A módosítások elsősorban annak érdekében történtek, hogy az allergén szempontból zavaró összetevőket eltávolítsuk úgy, hogy az anyag konzisztenciája ne változzon negatív irányba, és az előállítási folyamat reprodukálhatóan megvalósítható legyen. Emellett szükséges volt olyan homogenizálási módszerek létrehozása, melyek a mintamátrixhoz kis mennyiségben adagolt tej-, tojás- és gliadin-fehérjék homogén eloszlását biztosítják. Ezt a tej- és tojásfehérjék esetében porkeveréssel, míg a gliadin esetében folyadék-homogenizálás és porkeverés kombinációjával oldottuk meg.¹¹⁻¹³

Az alapanyag-fejlesztés és a homogenizálási kísérletek eredményeként sikerült előállítási protokollokat létrehozni a tej, a tojás a gliadin referencia anyagok előállításához.

2.2. A referencia anyagok és előállítási folyamatuk jellemzése

Az analitikai célra szánt referencia anyag előállításának megbízhatósága szempontjából döntő fontosságú a mintákban a mérendő fehérjék homogén eloszlásának biztosítása, valamint az egyes sarzsok közötti bizonytalanság, vagyis a független tételek előállításából eredő hiba mértékének megállapítása. E két tényezőtől becsülhető a mintamátrix alkalmazásából eredő véletlen hiba nagysága. Ennek becslése érdekében valamennyi modelltermékre kísérlettervet állítottunk össze, melyben 3-3 párhuzamos sarzsot készítettünk az előzőekben említett előállítási protokollok szerint. Az alkalmazott koncentráció-szintek a következők voltak:

- Tej: 0, 100 mg/kg tejpor
- Tojás: 0, 1000 mg/kg tojáspor
- Glutén: 0, 10, 50 mg/kg gliadin

A mintákat több alkalommal, 3-5 párhuzamos alkalmazásával ELISA módszerrel mértük. Az adatokat összefoglalva elmondható, hogy a fejlesztett referencia anyagokban a mérendő fehérjék eloszlása homogénnek tekinthető mind sarzsokon belül, mind sarzsok között, mely arra utal, hogy az előállítási folyamat standardizálása megvalósítható. Emellett a kapott adatok segítségével becsülhetővé válik a mérés során a modelltermék alkalmazásából eredő hiba mértéke adott ELISA kit esetében.

2.3. Az ELISA módszerek teljesítményjellemzőinek vizsgálata a referencia anyagok segítségével

Az előállított referencia anyagok lehetővé tették, hogy az eddigieknél részletesebben és megalapozottabban hasonlíthassuk össze a jelenleg hozzáférhető és rutinanalitikában használható kitek analitikai teljesítményét

és – közvetett módon – értelmezzük az eredmények mögött álló fizikai-kémiai jelenségeket. Lehetővé vált továbbá az egyes módszerek egyedi analitikai bizonytalanságainak, rendszeres és véletlenszerű hibáinak becslése, a hiba lehetséges forrásainak azonosítása is. Ehhez az analitikai teljesítményjellemzők közül a pontosságot, valamint a precizitást, utóbbit pedig az ismételhetőséget és a reprodukálhatóságot vizsgáltuk.

A módszerek **pontosságát** az adott analit visszanyerés értékei alapján becsültük, amely során azt tapasztaltuk, hogy a visszanyerések egyik kit esetében sem érték el a nominális értéket (feldolgozatlan minták esetében ELISA kittől függően 48-96%-os visszanyerési értékek adódtak). Emellett azt is megállapítottuk, hogy a visszanyerés értékek a sült termékek esetében jelentősen lecsökkentek a natív fehérjét tartalmazó, feldolgozatlan alapanyag-keverékhez képest (ELISA kittől függően 5-72%-os visszanyerési értékeket tapasztaltunk). A visszanyerési értékek alakulását nagymértékben befolyásolhatják a minták elméleti koncentrációjának számításnak alapjául szolgáló összefüggések, valamint a feldolgozási folyamat.

Az **ismételhetőség** meghatározására az ELISA kitek standard oldatsorainak egyes tagjait a referencia anyagokkal együtt mintaként vittük fel az ELISA lemezre és a kalibrációs görbe alapján meghatároztunk allergén fehérje-tartalmukat. A kapott szórásadatokat tanulmányozva az összes kit esetében megállapítható, hogy a referencia anyag előállításának bármely fázisából származó (porkeverék, nyers tézsa és sült termék) mintával kapott szórásérték a módszerek kalibrációjához használt standard anyagok szórásaival összemérhető, sőt egyes esetekben annál kisebbnek adódott. Ez azt jelzi, hogy referencia anyagunk homogenitása megfelelő, másrészt, hogy az analitikai eredmények bizonytalansága nagyrészt a módszer saját bizonytalanságából ered. Vagyis a modelltermék-előállítás és a mérés kivitelezése során nem történt olyan véletlen hiba, mely a mérési adatok bizonytalanságát jelentősen megnövelné. Fontos megjegyezni azt is, hogy a standard oldatok szórásainak alakulása koncentrációfüggést mutat, növekvő koncentrációhoz növekvő bizonytalanság társul.

Az ismételhetőség és a **reprodukálhatóság** összehasonlítása során a tej ELISA és a gliadin ELISA esetében a várt eredmény adódott, vagyis a reprodukálhatósági szórások nagyobbak adódtak, a mérés bizonytalansága megnövekedett. A többi esetben azt tapasztaltuk, hogy vagy nincs szignifikáns különbség, vagy a reprodukálhatósági szórásérték kisebb, mint az ismételhetőség esetében. Ez részben a módszerek érdeme, részben a kifejlesztett anyagunk alkalmazhatóságának köszönhető.

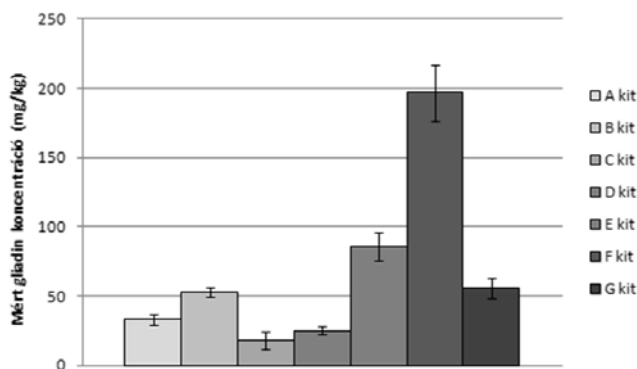
2.4. Kereskedelmi forgalomban kapható glutén ELISA kitek összehasonlító vizsgálata

A gliadin tartalmú referencia anyag esetében lehetőségünk volt arra, hogy elvégezzük hét, kereskedelmi forgalomban kapható, glutén meghatározására alkalmas ELISA kit összehasonlító vizsgálatát.¹⁴ A kísérletsorozat újszerűsége, hogy az összehasonlító elemzést elsőként végeztük el feldolgozott mátrixból készült referencia anyaggal. Ennek előnye, hogy a referencia anyagok segítségével olyan kísérleteket tudunk megtervezni, melyek a reális mintamátrix

miatt a mindennapi gyakorlatot jobban megközelítő véletlen hibabecslés meghatározásával jellemezni képesek az egyes módszereket és képesek összehasonlítani azok teljesítményjellemzőit. Az eredmények komplex értékelése pedig alkalmat adhat az immunanalitikai módszerek kritikus pontjainak azonosítására, az ezekből származó hibák nagyságrendjének meghatározására is.

A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a különböző módszerek egy adott minta esetében eltérő eredményeket szolgáltatnak (1. ábra), mely élelmiszer-biztonsági kockázatot hordoz. A mért gliadin-koncentrációk eltérése főként a különböző ellenanyagok és extrakciós módszerek alkalmazásából ered, valamint abból a tényből, hogy a referencia anyagban alkalmazott gliadin összetétele eltérhet a kitek kalibrációjához használt kalibráló anyagoktól. Utóbbi felhívja a figyelmet a standardizált kalibráló anyagok hiányára, valamint arra a kérdésre, hogy ezeket az anyagokat hogyan válasszák meg.

Az adatokat vizsgálva megfigyelhető továbbá, hogy a módszerek közötti véletlen hibák nagysága (az ismétlésből eredő szórások) jelentősen nem tér el egymástól. Tehát az alkalmazott antitestek és mintaelőkészítési eljárások különbözősége összességében nem a véletlen hibákra, hanem a visszanyerési értékre (vagyis a módszer pontosságára) vannak hatással. Ennek felderítésére referencia anyag nélkül nem lett volna lehetőség.



1. Ábra. 50 mg/kg gliadin tartalmú sütemény elemzése kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kitekkel (kit kódok: A-G).

A képet még árnyaltabbá teszi, hogy az eddig tárgyalt tényezők mellett egy újabbat is figyelembe kell venni, vagyis a gliadin feldolgozott mátrixból történő meghatározását, a feldolgozás analitikai eredményekre gyakorolt hatását.

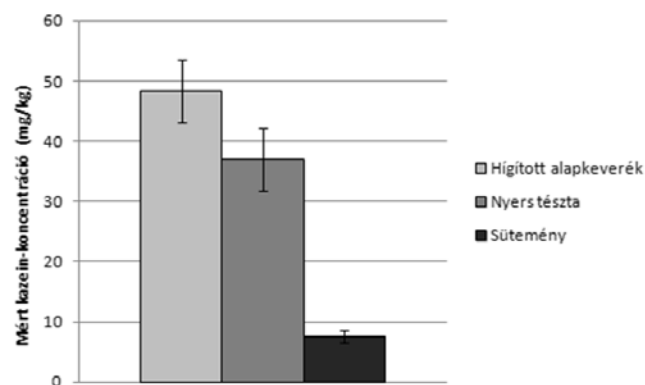
2.5. A feldolgozási folyamatok analitikai eredményekre gyakorolt hatásai

Az élelmiszerek legnagyobb részét feldolgozott formában fogyasztjuk, így fontos információt gyűjteni arról, hogyan hatnak a feldolgozási folyamatok a túlérzékenységi reakciókat kiváltó fehérjékre, és hogy ezek a molekuláris változások milyen mértékben befolyásolják az analitikai eredményeket. Az ilyen jellegű adatok a feldolgozott mátrixú referencia anyagok fejlesztése, és ezáltal a módszervalidálás szempontjából is fontosak.

Kísérleteink során a modelltermék-előállítás folyamat minden lépéséből (alapanyag-keverék, tészta, sütemény) mintát vettünk, így megteremtettük annak lehetőségét, hogy megvizsgáljuk, az egyes feldolgozási lépések miként hatottak az analitikai eredményekre.^{11-12, 14-15} Megállapítottuk, hogy a tésztaképződés folyamata a mérhető allergén-tartalmat nem befolyásolja.

Ugyanakkor a sült modelltermékek mért allergén fehérjetartalma szignifikánsan alacsonyabbnak adódik. Ez a jelenség egyértelműen a hőkezelés hatásának tulajdonítható (2. ábra). Elmondható tehát, hogy a hőkezelésnek, az alkalmazott kitektől függő mértékben, jelentős hatása van az immunanalitikai módszerek által szolgáltatott eredményekre, amit a módszerek fejlesztésekor nagyon fontos figyelembe venni.

A feldolgozás hatása alapvetően két módon befolyásolhatja az analitikai eredményeket. Egyrészt a bekövetkező fehérjemódosulások megváltoztathatják a fehérjék oldhatóságát, mely az extrakció hatékonyságát ronthatja. Másrészt a megváltozott fehérjeszerkezet hatására csökkenhet a fehérje ellenanyaghoz való affinitása, mely az analitikai detektálhatóságot ronthatja.¹⁶⁻¹⁷ A jelenség hátterében álló okok nincsenek pontosan felderítve, sok esetben csak feltételezések léteznek. A befolyásoló tényezők feltárásához molekuláris szintű vizsgálatokra is szükség lesz.



2. Ábra. A hőkezelés (180 °C) hatása tejpör tartalmú referencia anyag esetében (névleges koncentráció: 100 ppm tejpör).

3. Összefoglalás

Az új modelltermékek kidolgozásával és felhasználásukkal lehetőség nyílt arra, hogy az ELISA módszerek kivitelezése során jelentkező hibákat becsüljük úgy, hogy a mérési adatokat ismert névleges koncentrációhoz hasonlítjuk. Ezen hiba nagysága jellemzi az ELISA módszer alkalmazhatóságának lehetőségeit és korlátait. A jelenlegi szabályozás ugyanis nem veszi figyelembe a fent leírt jelenségekből adódó mérési bizonytalanságot. Így az élelmiszer-gyártókkal szemben olyan követelményeket támaszt, melyek megbízható igazolására a jelenlegi módszertan nem alkalmas. Ez felhívja a figyelmet az analitikai módszertan továbbfejlesztésének és a területen folyó fejlesztő munka harmonizációjának szükségességére.

4. Kísérleti rész

A referencia anyagok előállításának alapjául egy, Scaravelli és munkatársai¹⁰ által létrehozott modelltermék (sütemény) receptje szolgált, melyet eredetileg mogoró meghatározására alkalmas PCR módszerek fejlesztéséhez alakítottak ki. Az anyagfejlesztés két fő lépése a recept módosítása, valamint a tej-, tojás- és gliadin fehérjék homogenizálási módszereinek kidolgozása volt. Ennek megfelelően a kísérletek során alkalmazott referencia anyagok kialakítása is a kutatómunka részét képezte.

A referencia anyagok analitikai vizsgálatához olyan kísérlettervet állítottunk össze, mely lehetővé tette azt is, hogy a feldolgozási folyamat analitikai eredményekre gyakorolt hatását jellemezhesük. Az elkészült sült modelltermékeket, valamint az előállítás korábbi lépéseiből származó alapanyag-keverékeket és nyers tésztákat ELISA módszerek felhasználásával elemeztük (Tepnel BIODIAG Casein Assay Kit, RIDASCREEN Fast Ei/Egg Protein, RIDASCREEN Gliadin).

A gliadin referencia anyag segítségével elvégeztük továbbá hét, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit összehasonlító vizsgálatát (AgraQuant Gluten Assay (Romer Labs), BIODIAG Gluten Assay Kit (Tepnel), Gliadin ELISA (ELISA Systems), HAVEN Gluten-Check ELISA kit (Diagnostic Innovations), RIDASCREEN Gliadin (R-Biopharm), Veratox Quantitative Gliadin Test (Neogen), Wheat protein ELISA kit (Gliadin) II (Morinaga)).

Az ELISA mérések kivitelezése és az adatok kiértékelése a gyártók által szolgáltatott használati útmutató szerint történt, emellett a kapott eredményeket az átlagok és szórások vizsgálatával, valamint t-próbákkal statisztikailag is elemeztük.

Köszönetnyilvánítás

A kutatómunkát az EU 6. Keretprogramja által támogatott MoniQA Kiválóságshálózat (FOOD-CT-2006-036337) és a „Minőségorientált, összehangolt oktatási és K+F+I stratégia, valamint működési modell kidolgozása a Műgyetemen” c. projekt (TAMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0002), a Varga József Alapítvány, valamint az állami doktori ösztöndíj támogatta. Köszönet illeti a következő cégeket, akik a glutén ELISA összehasonlító vizsgálatához ingyen kitéket

biztosítottak: Diagnostic Innovations (Egyesült Királyság), ELISA Systems (Ausztrália), Morinaga (Japán), Neogen (USA), Romer Labs (Ausztria) és Tepnel (Egyesült Királyság).

Hivatkozások

1. Taylor S. L.; Hefle S. L. *Food Technol.* **2001**, *55*, 68-83.
2. Sicherer S. H.; Sampson H. A. *J. Allergy Clin. Immun.* **2010**, *125*, S116-S125.
3. Gendel S.; Buchanan R.; Dennis S.; Acheson D.; Assimon S. A.; Beru N.; Bolger P.; Carlson D.; Carvajal R.; Copp C.; Falci K.; Garber E.; Harden E.; Kane R.; Kvenberg J.; Luccioli S.; Park D.; Raybourne R.; Troxell T.; Vierk K. J. *Food Prot.* **2008**, *71*, 1043-1088.
4. Hischenhuber C.; Crevel R.; Jarry B.; Mäki M.; Moneret-Vautrin D. A.; Romano A.; Troncone R.; Ward R. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2006**, *23*, 559-575.
5. Kerbach S.; Alldrick A. J.; Crevel R. W. R.; Dömötör L.; DunnGalvin A.; Mills E. N. C.; Pfaff S.; Poms R. E.; Popping B.; Tömösközi S. *Qual. Assur. Saf. Crop.* **2009**, *1*, 50-60.
6. Poms R.; Emons H.; Anklam E. *In Detecting Allergens in Food*; Koppelman S.J.; Hefle S.L. Ed.; Woodhead Publishing Ltd.: Cambridge, **2006**; pp. 348-356.
7. Abbott M.; Hayward S.; Ross W.; Godefroy S. B.; Ulberth F.; van Hengel A. J.; Roberts J.; Akiyama H.; Popping B.; Yeung J. M.; Wehling P.; Taylor S. L.; Poms R. E.; Delahaut P. J. *AOAC Int.* **2009**, *93*, 442-450.
8. Takács K.; Szamos J.; Janáky T.; Polgár M.; Gelencsér É. *Food Agr. Immunol.* **2010a**, *21*, 317-334.
9. Takács K.; Szamos J.; Kovács E.; Janáky T.; Polgár M.; Gelencsér É. *Sütőiparosok Pékek.* **2010b**, *57*, 27-32.
10. Scaravelli E.; Brohee M.; Marchelli R.; van Hengel A. J. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 857-869.
11. Bugyi Zs; Nagy J; Török K; Hajas L; Tömösközi S. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, *672*, 25-29.
12. Bugyi Zs; Török K; Hajas L; Adonyi Zs; Diaz-Amigo C; Popping B; Poms R; Kerbach S; Tömösközi S. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 382-387.
13. van Eckert R.; Berghofer E.; Ciclitira P. J.; Chirido F.; Denery-Papini S.; Ellis H. J.; Ferranti P.; Goodwin P.; Immer U.; Mamone G.; Méndez E.; Mothes T.; Novalin S.; Osman A.; Rumbo M.; Stern M.; Thorell L.; Whim A.; Wieser H. J. *Cereal Sci.* **2006**, *43*, 331-341.
14. Bugyi Zs; Török K; Hajas L; Adonyi Zs; Popping B; Tömösközi S. *Qual. Assur. Saf. Crop.* **2013**, *5*, 79-87.
15. Bugyi Zs; Kovács A; Óri Zs; Tömösközi S. *In Gluten Proteins 2009*, Gérard Branlard Ed., INRA. **2009**; pp. 320-322.
16. Thomas K.; Herouet-Guicheney C.; Ladics G.; Bannon G.; Cockburn A.; Crevel R.; Fitzpatrick J.; Mills C.; Privalle L.; Vieths S. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 1116-1122.
17. Monaci L.; Brohee M.; Tregoeat V.; van Hengel A. *Food Chem.* **2011**, *127*, 669-675.

Improving the conditions of the analytical methodology for the quantification of food allergens

Food-induced hypersensitivity reactions (e.g. allergies, intolerances) are representing a significant food safety issue. The only effective treatment of classic food allergies and other individual disorders (e.g. celiac disease) is a diet excluding the food components responsible for triggering the symptoms.

In order to ensure the safety of the affected population it is necessary to precisely and reliably quantify the allergenic components present in foodstuffs even in low concentration ranges. To reach this goal validated analytical methods are needed. In case of the most widely

used immunoanalytical-based ELISA methodology validation is limited by - together with other factors - the lack of reference materials and reference methods.

For supporting the validation of analytical methods for allergen quantification, the main objective of this work was the development of reference materials containing major allergenic proteins (milk, egg, and gliadin) in a processed food matrix. With the help of the developed reference materials we determined the analytical performance of the related ELISA methods, the uncertainty of the measurements and the effects of food processing on the measurable

protein content. We also attempted to identify the molecular, chemical and physical background of the experienced phenomena.

The major outcome of this work is that we developed three reference materials containing milk, egg and gliadin proteins in known amount in a processed food matrix. Besides, the production procedure of the reference materials was standardized and a production protocol was created for all of the produced reference materials. We also determined the analytical uncertainty originated from the production process.

With the application of the reference materials we studied certain performance characteristics of the applied ELISA methods. Applying realistic food matrices was a step forward compared to the previously applied unprocessed model matrices. With the help of the new materials, performance characteristics of the currently available ELISA methods can be determined more precisely, just like the analytical uncertainty of the methods and the phenomena occurring during the analysis of real food samples can be studied more effectively.

The reference materials also made it possible to carry out a comparative study of commercially available gluten ELISA kits that was implemented with a reference material in a realistic food matrix for the first time. We observed that the results of the analysis of a certain sample varied among the kits (Fig.1.). During this experiment we identified several factors that can affect the

analytical results (e.g. applied antibody, extraction method). We also found that these factors are mostly influencing the accuracy of the measurement and not its precision.

The effects of heat treatment on the analytical results were also investigated with the help of reference materials. We found that heat treatment reduces the measurable allergenic protein content (Fig.2.). Thus, heat treatment influences the solubility and immunoaffinity of the proteins (or both) through changing their structure.

The developed reference materials can be used as standard materials for method development and method validation. Besides, as the analyte went through all steps of food processing, errors of the ELISA methods can be modelled more reliably using these materials and the limitations of the methodology can be estimated more precisely. This information can be used for refining official thresholds and for determining the future trends of analytical method development. With the application of the reference materials, factors causing the variability of the analytical data can be identified better (e.g. target molecules, antibodies, calibrators, effects of processing) that could be useful for improving the methodology. Improving the analytical methods together with the improvement of the results of clinical research could result in a more precise allergen policy helping the work of food manufacturers, this way enhancing the safety of consumers and widening the range of the products available for them.