

# Akademia Bezpieczeństwa żywności - webinary

24/04/2023

System FAST 7500 – jako narzędzie w monitorowaniu mikrobiologicznego bezpieczeństwa żywności.

24/05/2023

Monitoring środowiska produkcyjnego żywności.

26/06/2023

Alergeny i mykotoksyny w żywności.



ARGENTA



ARGENTA

# Alergeny i mykotoksyny w żywności



# Agenda

1. **Alergeny**
2. **Mykotoksyny**
3. **Testy identyfikujące alergeny i mykotoksyny w żywności**
  - I. Technika LC-MS/MS
  - II. Testy ELISA
  - III. Testy LFT
  - IV. Metoda PCR
4. **Testy ELISA i LFT – produkty firmy Gold Standard Diagnostics**



ARGENTA

# Alergeny



# Alergeny

**Alergeny pokarmowe** – białka, które dostają się do organizmu razem z pokarmem i mogą prowadzić u niektórych osób do wystąpienia objawów alergii, czyli reakcji nadwrażliwości, która może objawiać się np. poprzez wstrząs anafilaktyczny, wysypkę czy inne zmiany skórne.

## **Pokarmy najczęściej wywołujące alergię pokarmowe to:**

- mleko krowie
- jaja
- owoce morza
- ryby
- orzechy (laskowe, włoskie, nerkowca, brazylijskie)
- orzeszki arachidowe
- soja
- pszenica



ARGENTA



# Alergeny - akty prawne

**Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r.** w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności, określa, że w oznakowaniu żywności – na etykietach, opakowaniach – obowiązkowe jest podanie m.in. nazwy żywności, wykazu składników, ilości żywności netto, daty minimalnej trwałości lub terminu przydatności do spożycia, wartości odżywczej, nazwy lub firmy i adres podmiotu, który wprowadza produkt do obrotu, jak również **informacji o substancjach lub produktach powodujących alergie lub reakcje nietolerancji, które zostały użyte przy wytworzeniu lub przygotowywaniu żywności i nadal są obecne w produkcie gotowym (nawet w zmienionej formie).**

**ZAŁĄCZNIK II** Substancje lub produkty powodujące alergie lub reakcje nietolerancji.

**Rozporządzenie 828/2014 z 20 lipca 2016 w** sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat nieobecności lub zmniejszonej zawartości glutenu w żywności

**Zawiadomienie Komisji z dnia 13 lipca 2017 r.** dotyczące przekazywania informacji o substancjach lub produktach powodujących alergie lub reakcje nietolerancji, wymienionych w załączniku II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności.

**„Aktualne akty prawne nakazują przekazywanie konsumentowi jednoznacznych informacji dotyczącej obecności alergenów oraz o braku lub zmniejszonej zawartości glutenu w produktach spożywczych.”**



ARGENTA

# Lista 14 alergenów (EU) - składniki żywności, które należy zadeklarować jako alergeny w UE

- **zboża** zawierające gluten, tj. pszenica (w tym orkisz i pszenica khorasan), żyto, jęczmień, owies, lub ich odmiany hybrydowe, a także produkty pochodne,
- **skorupiaki** i produkty pochodne,
- **jaja** i produkty pochodne,
- **ryby** i produkty pochodne,
- **orzeszki ziemne** (arachidowe) i produkty pochodne,
- **soja** i produkty pochodne,
- **mleko** i produkty pochodne



- **orzechy**, tj. migdały, orzechy laskowe, orzechy nerkowca, orzechy włoskie, orzechy brazylijskie, pistacje, orzechy makadamia, orzechy pekan, orzechy piniowe i produkty pochodne,
- **seler** i produkty pochodne,
- **gorczyca** i produkty pochodne,
- **nasiona sezamu** i produkty pochodne,
- dwutlenek siarki i siarczyny (powyżej 10 mg/kg lub 10 mg/litr),
- **łubin** i produkty pochodne,
- **mięczaki** i produkty pochodne.



ARGENTA

# Obszary istotne dla nadzorowania obecności alergenów w żywności

Kwalifikowanie dostawców

Procedury przyjęcia dostaw (surowce, materiały opakowaniowe)

Gospodarka magazynowa - segregacja, zabezpieczenie składników i produktów zawierających alergeny

Procedury czyszczenia, mycia i dezynfekcji

Analiza receptur – zarządzanie zmianami w recepturach

Projektowanie wyrobu

Procedura przerobu produktu (rework)

Oznakowanie produktu

Szkolenie personelu



ARGENTA



# Mykotoksyny

The background of the slide is a solid red color. It features a blurred, high-magnification image of a glass pipette tip positioned over several circular, ring-like structures, which are likely fungal spores or hyphae. On the right side of the slide, there is a decorative pattern of white, overlapping geometric shapes, specifically triangles and diamonds, arranged in a grid-like fashion.

# Mykotoksyny (Mikotoksyny)



Mykotoksyny są substancjami toksycznymi – metabolitami – wytwarzanymi przez kilka rodzajów grzybów (pleśni): ***Aspergillus***, ***Penicilium***, ***Fusarium***. Z racji tego, że mykotoksyny są niewidoczne, bezzapachowe oraz cechują się stabilnością chemiczną w wysokich temperaturach i w długim czasie, to trudno je wykryć.

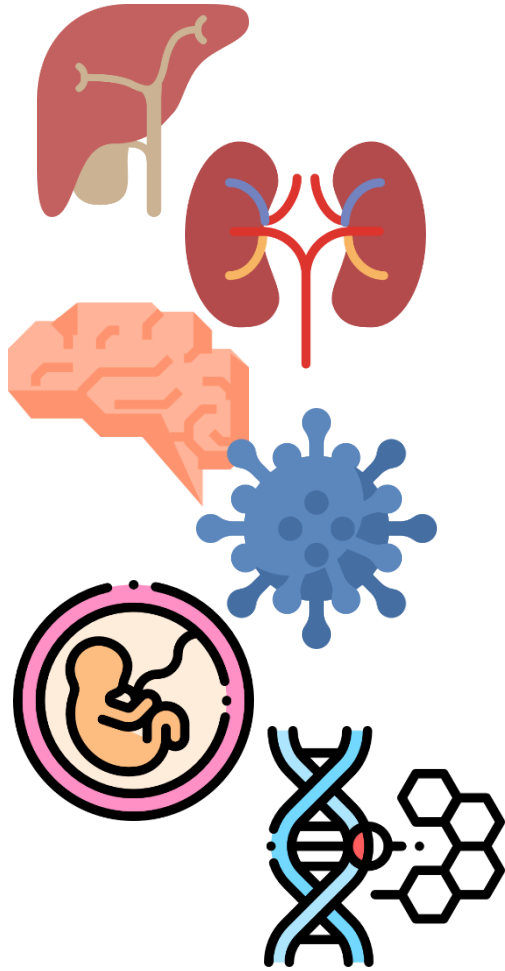
Mogą dostać się poprzez skażoną żywność, głównie zboża, do łańcucha żywnościowego człowieka.

Wykazują się szkodliwym wpływem na zdrowie, stąd konieczność wykonywania badania na obecność mykotoksyn w produktach.



ARGENTA

# Działanie mykotoksyn

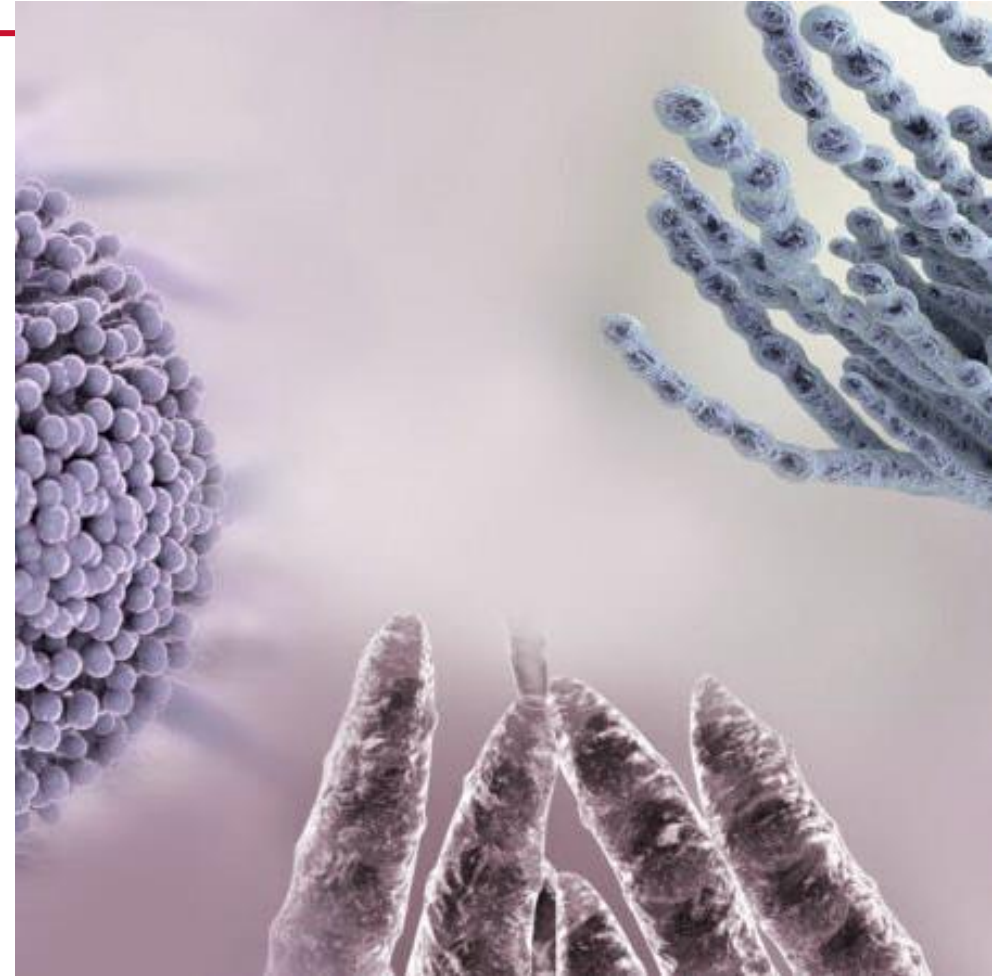


- **Hepatotoksyczne**
- **Nefrotoksyczne**
- **Neurotoksyczne**
- **Immunotoksyczne**
- **Teratogenne**
- **Mutagenne**



# Mykotoksyny

- Są wytwarzane w warunkach z podwyższoną wilgotnością i temperaturą.
- Produkowane przez grzyby w zakresie temperatury 7-40°C
- Na ich rozpowszechnienie wpływa m.in. Aktywność wody, warunki panujące na polu i podczas przechowywania
- Są szeroko rozpowszechnione w klimacie tropikalnym i subtropikalnym
- Regiony, w których pojawiają się naprzemiennie okresy wysokich opadów i okresy susze, są najbardziej narażone na rozwój mykotoksyn



ARGENTA





Spośród ponad 400 rodzajów mykotoksyn w warunkach klimatycznych Polski najbardziej

istotne to:

**Aflatoksyny**

**DON**

**Zearalenon**

**Fumonizyny**

**Ochratoksyna**

**Toksyna T2/HT2**



ARGENTA



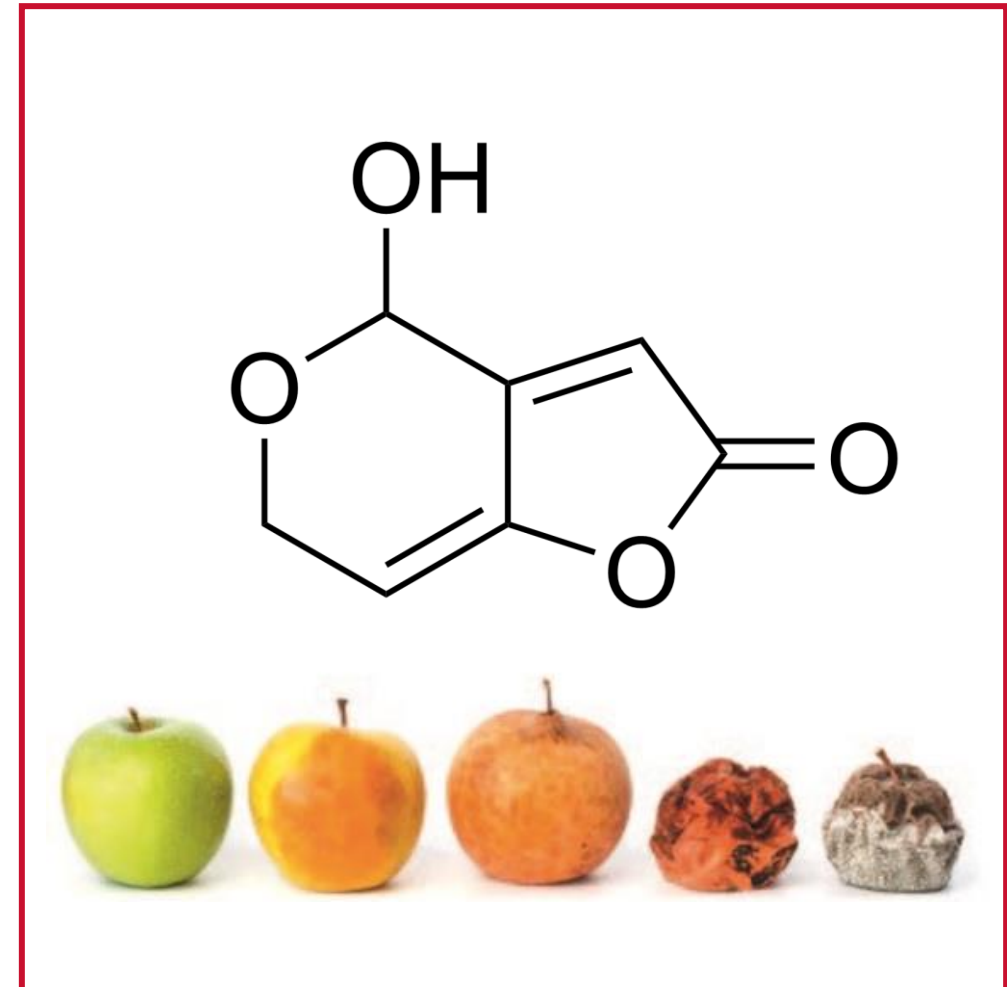
# Mykotoksyny

- Występują głównie w kukurydzy, jęczmieniu, pszenicy, ryżu, mleku, nasionach oleistych, suszonych owocach
- **Mykotoksyny:**
  - **Uprawne:** DON, Zearalenon (ZEA/ZON), T2/HT-2, Fumonizyna (FUMO)
  - **Magazynowe:** Ochratoksyna (OCHTA/OTA), Aflatoksyna (AFLA)



# Patulina

- Toksyczny metabolit niektórych gatunków pleśni (m.in. z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus* oraz *Byssochlamys nive*)
- Rozwija się na wielu gatunkach warzyw i owoców. Powszechnie spotykana na jabłkach (i ich przetworach) w stężeniach niebezpiecznych dla człowieka
- Wykazuje właściwości mutagenne, teratogenne i prawdopodobnie rakotwórcze.
- Oporna na działanie wysokich temperatur oraz wysoka stabilność w kwaśnym środowisku.
- Dopuszczalne stężenie wg WHO w soku jabłkowym wynosi 50 µg/kg



# Mykotoksyny – akty prawne

Najwyższe **dopuszczalne limity** ilości mykotoksyn w środkach spożywczych zostały określone **Rozporządzeniem Komisji (WE) NR 1881/2006** z dnia 19 grudnia 2006 r., które narzuca obowiązek ich badania w narażonych na ich obecność grupach produktów.

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) NR 401/2006

z dnia 23 lutego 2006 r.

- **Kryteria skuteczności**
- **Ilość pobranej próbki**

ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) 2021/1399

z dnia 24 sierpnia 2021 r.

zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów przetrwalników buławinki czerwonej i alkaloidów sporyszu w niektórych środkach spożywczych

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

ZALECENIE KOMISJI

z dnia 17 sierpnia 2006 r.

w sprawie obecności deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt

(Tekst mający znaczenie dla EOG)



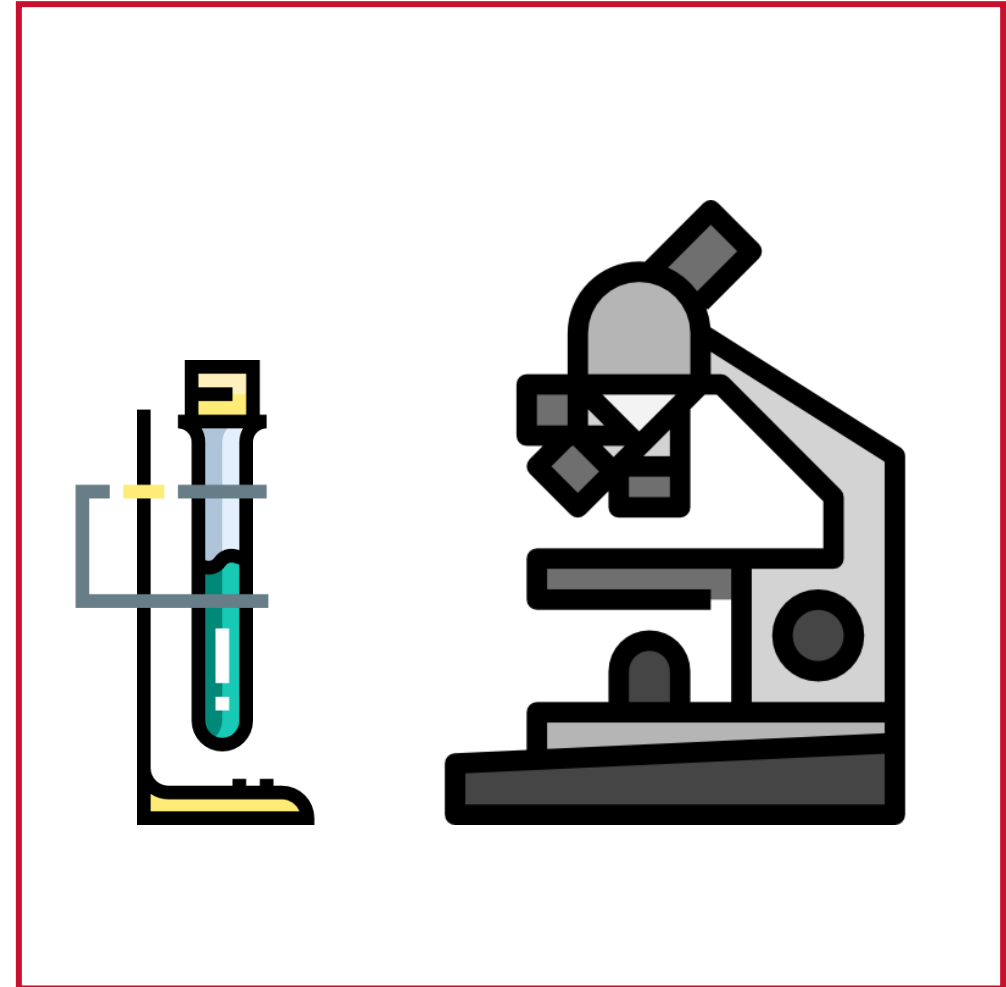
ARGENTA

# Mykotoksyny – Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1881/2006 - limity

Środki spożywcze		Najwyższe dopuszczalne poziomy (µg/kg)		
2.1	<b>Aflatoksyny</b>	<b>B1</b>	<b>Suma B1, B2, G1 i G2</b>	<b>M1</b>
2.1.1	Orzechy arachidowe, które mają być stosowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyte jako składnik w środkach spożywczych	8,0	15,0	
2.1.2	Orzechy, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyte jako składnik w środkach spożywczych	5,0	10,0	
2.1.3	Orzechy arachidowe i orzechy oraz przetworzone produkty z orzechów przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub użyte jako składniki w środkach spożywczych	2,0	4,0	
2.1.4	Suszone owoce, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyte jako składnik w środkach spożywczych	5,0	10,0	
2.1.5	Suszone owoce oraz przetworzone produkty z suszonych owoców przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub użyte jako składnik w środkach spożywczych	2,0	4,0	
2.2	<b>Ochratoksyna A</b>	<b>Najwyższe dopuszczalne poziomy (µg/kg)</b>		
2.2.1	Nieprzetworzone zboża	5,0		
2.2.2	Wszystkie produkty z nieprzetworzonych zbóż, w tym produkty z przetworzonych zbóż oraz zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi z wyjątkiem środków spożywczych wymienionych w pkt 2.2.9 i 2.2.10	3,0		
2.2.3	Suszone owoce winorośli (koryntki, rodzynki i sułtanki)	10,0		
2.2.4	Palone ziarna kawy i mielona kawa palona, z wyjątkiem kawy rozpuszczalnej	5,0		
2.2.5	Kawa rozpuszczalna	10,0		

# Badanie Mykotoksyn – Pobieranie próbek

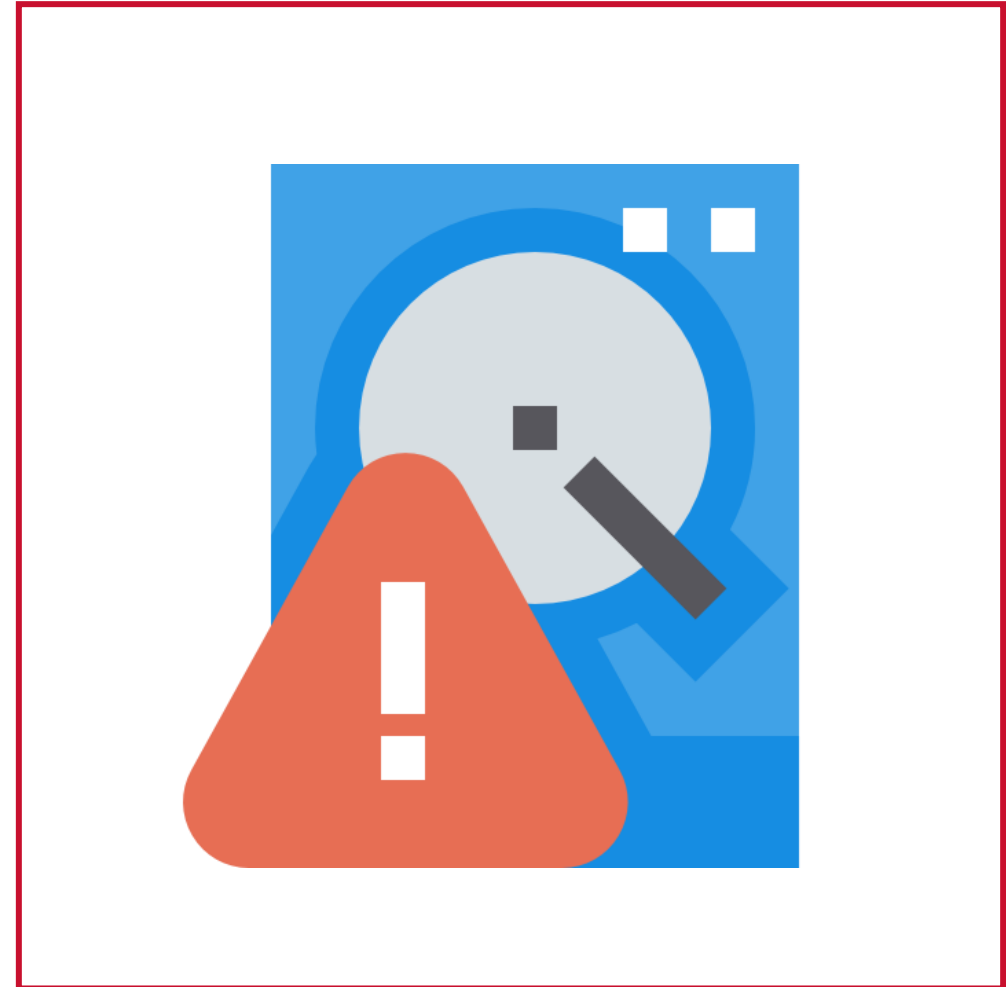
- Ze względu na niejednorodny charakter próbek stałych - są one badane punktowo
- Aby próbka była reprezentatywna ważna jest wielkość i liczba próbek pobranych z różnych miejsc badanej partii
- Próbki powinny być dobrze zmielone i wymieszane – homogenizacja
- Waga próbki do analizy nie może być zbyt mała
- Pobieranie próbek jest zwykle największym źródłem zmienności związanej z procedurą badania mykotoksyn





# Najczęstsze błędy podczas badań

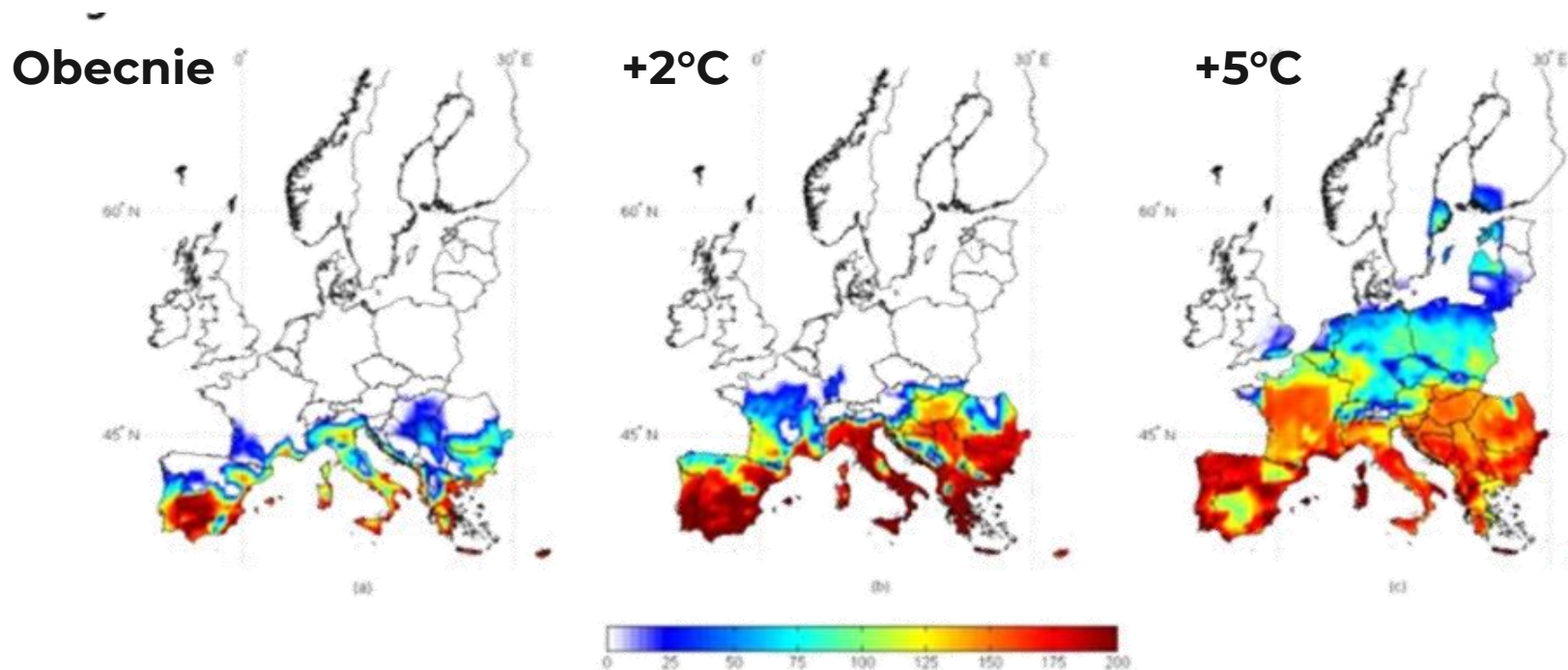
- Zbyt mała ilość pobranej próbki
- Nieprawidłowe zmielenie
- Temperatura
- Ilość wykonywanych analiz na jednej próbce
- Brak regularnych sprawdzeń aparatury
- Precyzyjność odważania
- Sprawdzanie sprzętu (wagi/pipety)
- Brak zatrzymania reakcja (zwiększenie wyniku)



# Mykotoksyny - Trendy

Szacuje się, że z roku na rok, stężenie mykotoksyn w badanych produktach będzie wzrastać, co wiąże się m.in. ze zmianami klimatycznymi.

Zmiany te dotyczą, m.in. wzrostu średniej temperatury powietrza, a także zmiany poziomu wilgotności, co może mieć znaczący wpływ na zwiększony rozwój mykotoksyn.



Model występowania Aflatoksyn w Europie w zależności od wzrostu średniej temperatury

Battilani, P., Toscano, P., Van der Fels-Klerx, H. *et al.* Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep* 6, 24328 (2016).

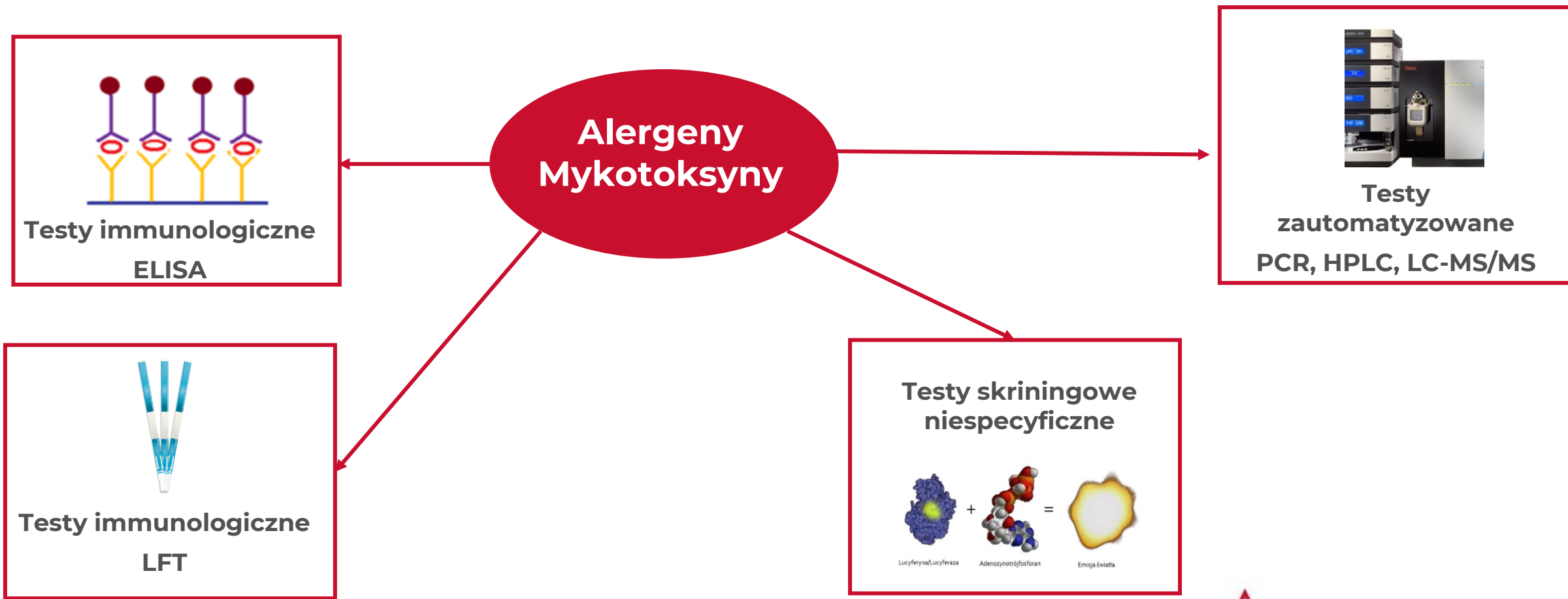


ARGENTA

The background is a solid red color. It features faint, semi-transparent images of laboratory glassware, including a pipette and several petri dishes, arranged diagonally. On the right side, there is a repeating geometric pattern of white lines forming a grid of diamonds and squares.

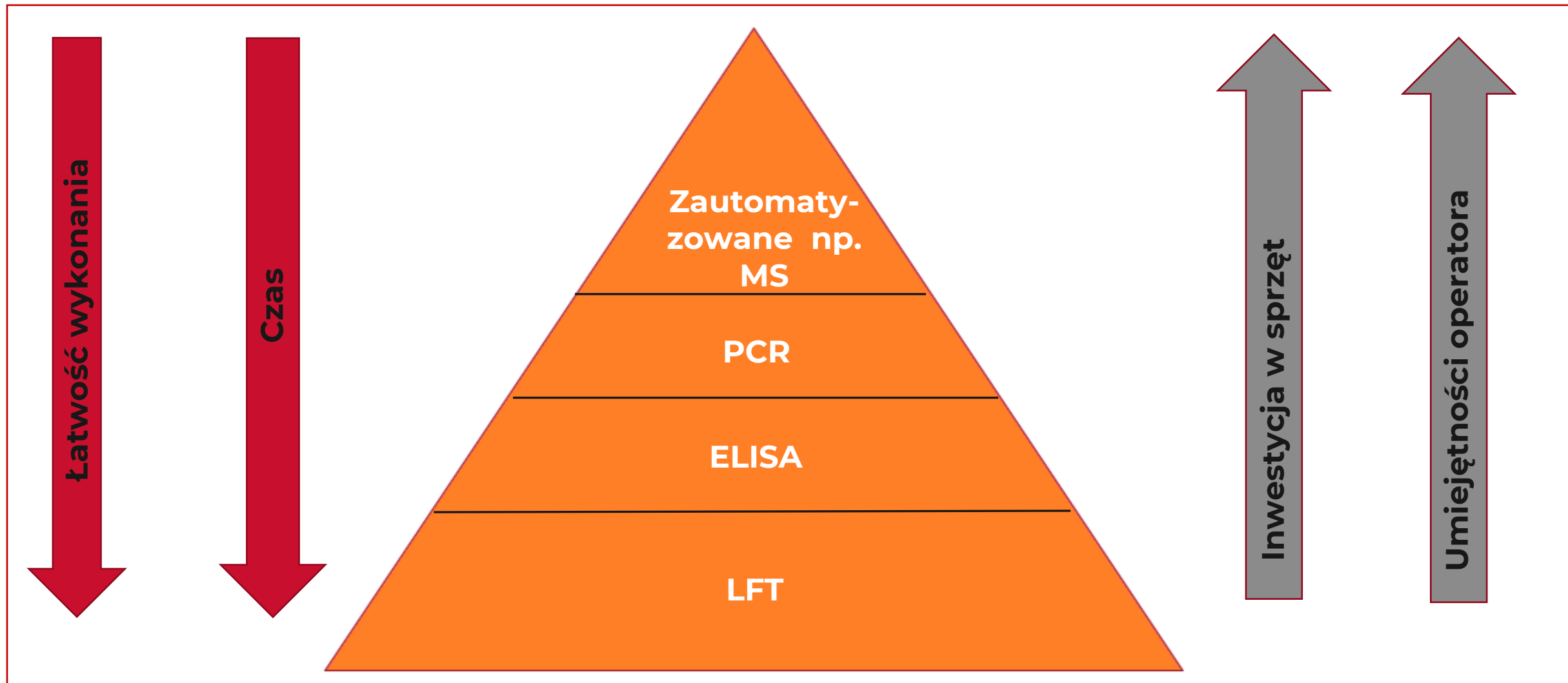
# Testy identyfikujące alergeny i mykotoksyny w żywności

# Rodzaje testów ze względu na zastosowaną technikę



ARGENTA

# Dobór techniki



ARGENTA



# Na co zwrócić uwagę przy wyborze testu lub techniki?



1. Jakie alergeny chcemy wykryć/oznaczyć?



2. Jaki rodzaj próbek będziemy badać?

3. Jakie ilości próbek i jak często będziemy badać?



4. Jakich wyników oczekujemy: ilościowych czy jakościowych?

5. Jakie parametry pracy testu (czułość, granice oznaczalności, czas uzyskania wyniku) są dla nas zadawalające?



6. Jakim wyposażeniem laboratoryjnym dysponujemy?

7. Jakie kwalifikacje posiada personel laboratorium?



8. Jaki koszt uzyskania jednego wiarygodnego wyniku jest dla nas akceptowalny?



The background is a solid red color. On the left side, there is a blurred image of laboratory glassware, including several test tubes and a pipette. On the right side, there is a white geometric pattern consisting of overlapping triangles and lines, forming a complex, crystalline structure.

# Technika LC-MS/MS

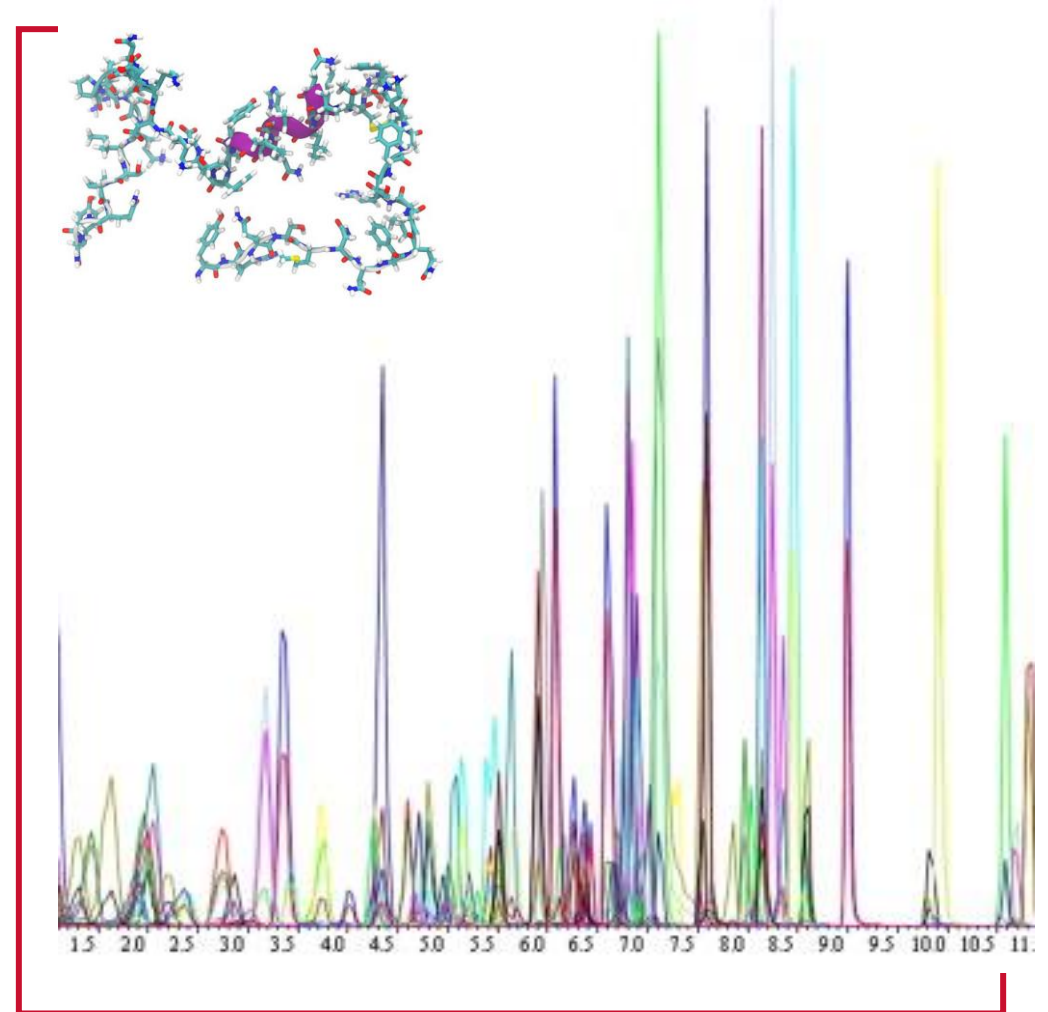
# Technika LC-MS/MS – zalety

- LC-MS/MS umożliwia bezpośrednio wykrycie białka alergennego, niezależnie od jego przestrzennego ułożenia łańcucha polipeptydowego, za pomocą chromatografii cieczowej (LC) połączonej z tandemową spektrometrią mas (MS/MS).
- Wysoka czułość i specyficzność.
- Do oznaczeń ilościowych.
- Umożliwia pomiar stężenia wielu alergenów jednocześnie w bardzo małych stężeniach.
- Metoda zalecana do żywności wysoko przetworzonej.



# Technika LC-MS/MS – warto wiedzieć, że...

- Nie analizuje białek, tylko peptydy, które stanowią ich strukturę.
- Przygotowanie i analiza próbek są czasochłonne i wymagają drogiego sprzętu laboratoryjnego.
- Wysoki koszt pojedynczego oznaczenia.



ARGENTA



The background is a solid red color. On the left side, there is a blurred image of laboratory glassware, including several test tubes and a pipette. On the right side, there is a white geometric pattern consisting of overlapping triangles and lines, forming a complex, crystalline structure.

# Testy ELISA

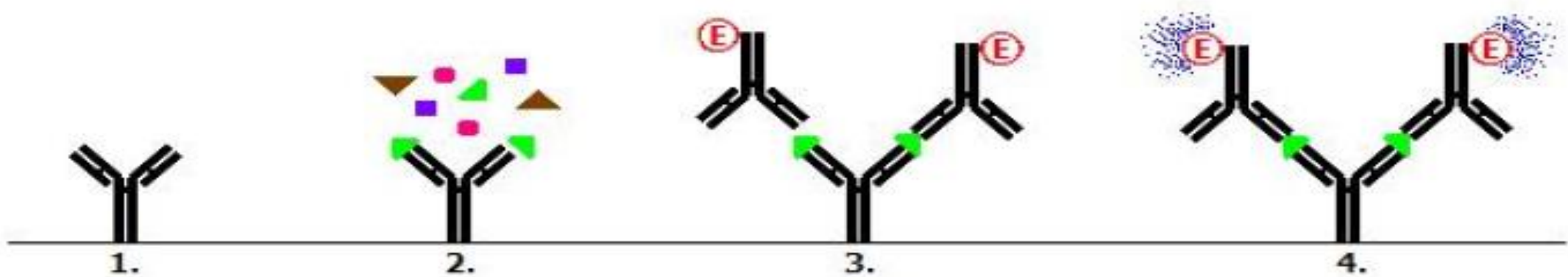


# Testy ELISA

- Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, czyli test immunoenzymatyczny stosujący enzymy do wykrywania reakcji antygen-swoiste przeciwciało.
- Reakcję antygen-przeciwciało uwidacznia się wykorzystując enzymatyczną reakcję barwną np. peroksydazy chrzanowej (daje niebieskie zabarwienie w obecności tetrametylobenzydyny).
- Zmianę intensywności barwy mierzy się spektrofotometrycznie, a wyniki kalibruje względem standardów tworząc krzywą wzorcową, pozwalającą na określenie ilości produktu reakcji.



# Technika Sandwich ELISA



1. Przeciwciała opłaszczono na ściankach mikrostudzienki.

2. Szukane białko obecne w ekstrakcie próbki wiąże się z przeciwciałem.

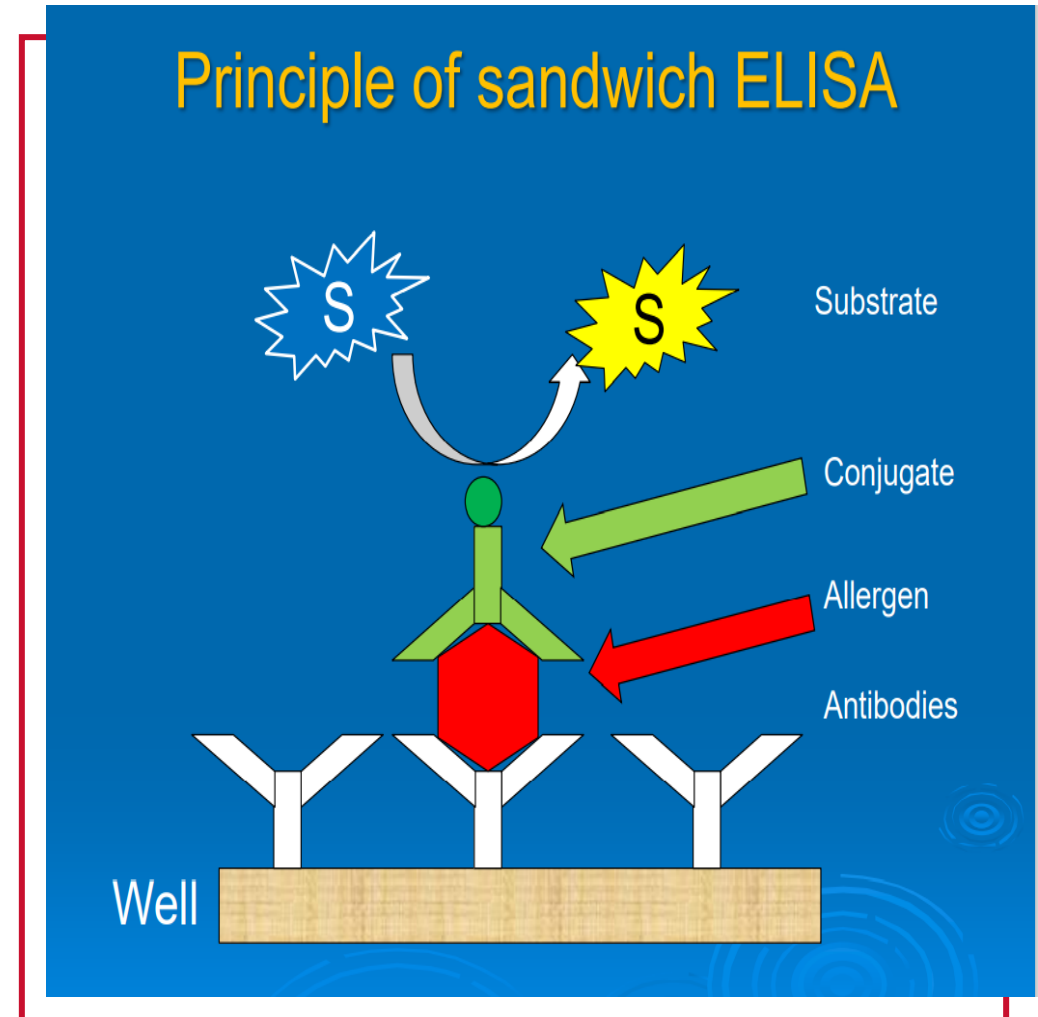
3. Przeciwciało znakowane enzymem HRP wiąże się z białkiem związanym z przeciwciałem opłaszczonym na ściance studzienki w studzience

4. Dodanie substratu TBM, który pod wpływem działania enzymu HRP daje niebieski kolor



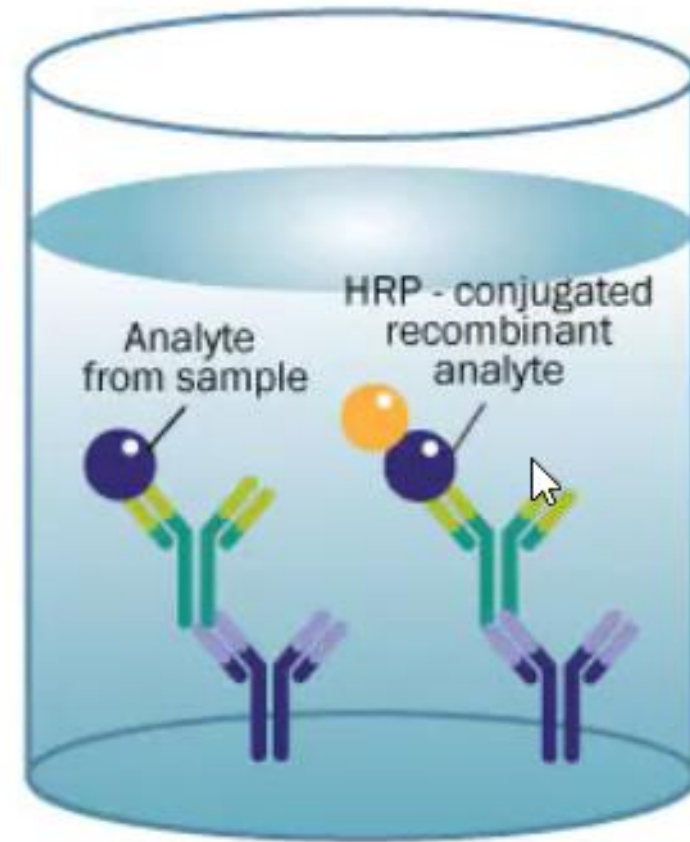
# Technika Sandwich ELISA

- Powstanie reakcji kanapkowej przeciwciało- antygen- przeciwciało jest „sercem” działania testów ELISA.
- Im więcej szukanego antygenu (białka) w próbce tym intensywniejsze zabarwienie środowiska reakcji, a więc wyższa wartość OD mierzona w spektrofotometrze.



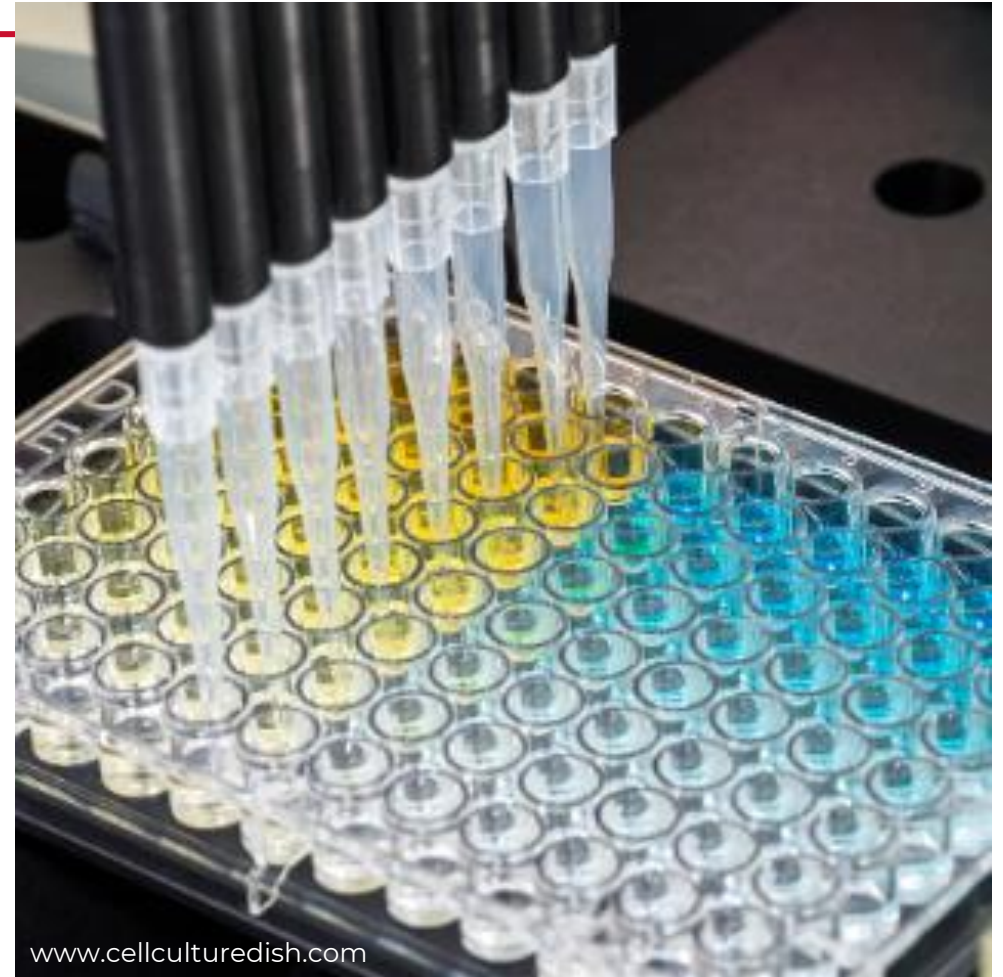
# Technika ELISA konkurencyjna

1. Ekstrakcja szukanego białka z próbki
2. Próbkę miesza się z koniugatem białko-peroksydaza chrzanowa.
3. Mieszaninę dodaje się do studzienki opłaszczonej specyficznym przeciwciałem.
4. Białko z ekstrahowanej próbki i koniugat peroksydaza chrzanowa-białko **konkuruje o wiązanie** z przeciwciałem opłaszczającym studzienkę.
5. Po określonym czasie studzienka jest opróżniana i płukana w celu usunięcia substancji niezwiązanych.



# Technika ELISA kompetycyjna

6. Po dodaniu substratu dla enzymu peroksydazy (TMB) zachodzi reakcja enzymatyczna w wyniku której zabarwienie zmienia się na niebieskie.
7. Po dodaniu kwasowego roztworu hamującego kolor zmienia się z niebieskiego na żółty.
8. Intensywność koloru w studzienkach mierzona jest optycznie przy użyciu czytnika mikroplótek o filtrze absorbancji wynoszącym 450 nm (OD450).
9. Natężenie koloru jest wprost proporcjonalne do ilości związanego koniugatu peroksydaza-białko i **odwrotnie proporcjonalne do stężenia szukanego białka w próbce lub standardzie. W związku z tym wraz ze wzrostem stężenia białka w próbce , mierzone OD maleje.**



ARGENTA



# Procedura wykonania testu ELISA

Naniesienie próbek, standardów i kontroli	po 100µl próbki /kontroli /standardów
Inkubacja	w temp. pokojowej
Płukanie	kilkakrotnie roztworem płuczającym.
Dodanie koniugatu	po 100µl koniugatu do studzienek.
Inkubacja	w temp. pokojowej
Płukanie	kilkakrotnie roztworem płuczającym.
Dodanie substratu TMB	po 100µl TMB do studzienek.
Inkubacja	w temp. pokojowej
Hamowanie reakcji	po 100µl kwasowego roztworu hamującego do studzienek.
Odczyt	w spektrofotometrze przy długości fali <b>450 nm</b> i wykreślenie krzywej.
Obliczenie wyniku	wyniki mg/kg (PPM) dla wszystkich kontroli/próbek na podstawie krzywej wzorcowej.





## Procedura - na co zwrócić uwagę?

Ze względu na bardzo wysoką czułość testu, podczas postępowania z próbkami laboratoryjnymi i odczynnikami należy stosować bardzo wysokie standardy czystości, z wykorzystaniem odpowiedniego sprzętu i czyszczenia pomiędzy wszystkimi etapami procesu i po jego zakończeniu.



ARGENTA

# Próbki wymazów

Próbki pobrane przy użyciu specjalnych wymazówek można użyć bezpośrednio, bez ich rozcieńczania.

Wymazówkę starannie wypłukuje się w rozcieńczalniku dołączanym do wymazówki.

Rozcieńczalnik z wymazem przenoszony jest bezpośrednio do studzienki testu.



ARGENTA

## Procedura - na co zwrócić uwagę?

Słabe wyniki powtórzeń są zazwyczaj spowodowane nieodpowiednią konserwacją pipet lub nieodpowiednim/niewystarczającym płukaniem studzienek.

Zastosowanie automatycznego systemu do płukania płytek ELISA skraca czas płukania płytek i poprawia spójność.



ARGENTA

# Procedura - na co zwrócić uwagę?

- Pipetowanie etanolowych ekstraktów może być utrudnione ze względu na ciśnienie wytwarzające się w końcówce pipety.
- W celu odpowietrzenia pipety zaleca się „odwrócone” pipetowanie; przed przystąpieniem do pipetowania należy kilka razy przepłukać końcówkę pipety.
- Należy unikać kropel odczynnika na zewnętrznej powierzchni końcówki pipety wprowadzanej do studzienek, w razie potrzeby ostrożnie przecierać końcówkę pipety czystą ściereczką.
- Zastosowanie wysokiej jakości wielokanałowych pipet dozujących (po 100  $\mu$ l) przyspiesza dodawanie odczynników HRP, TMB i odczynnika hamującego, zmniejszając rozbieżności pomiędzy oznaczeniami.
- Ostukiwać studzienki na warstwie ręczników chłonnych po każdym płukaniu, aby jak najdokładniej usunąć pozostałą ciecz.



# Procedura - na co zwrócić uwagę?

- Niektóre inne składniki zawarte w próbce mogą reagować z użytymi przeciwciałami dając fałszywie dodatnie wyniki oznaczenia- możliwość reakcji krzyżowych.
- Składniki o silnym zabarwieniu utrudniają właściwe odczytanie wyniku końcowego.
- Jeden test to jeden rodzaj alergenu/mykotoksyn na raz, więc każdy kolejny rodzaj alergenu/mykotoksyny potrzebuje nowego oznaczenia.
- W czasie przetwarzania żywności istnieje prawdopodobieństwo utraty właściwości immunologicznych alergenów/mykotoksyn. Czynności takie jak ogrzewanie, fermentacja, hydroliza mogą spowodować zmianę w strukturze białka co uniemożliwia właściwe związanie przeciwciała i fałszywie ujemny wynik.



# Procedura- na co zwrócić uwagę?

## Środowisko

- powietrze, blaty
- pomieszczenie
- materiały
- zestaw ELISA
- operator

## Przygotowanie próbki

- naważenie
- homogenizacja
- temperatura
- dokładność pipetowania
- zanieczyszczenia krzyżowe

## Wykonanie testu

- płukanie
- zanieczyszczenie studzienka-  
studzienka
- zanieczyszczenie odczynników
- temperatura
- czas

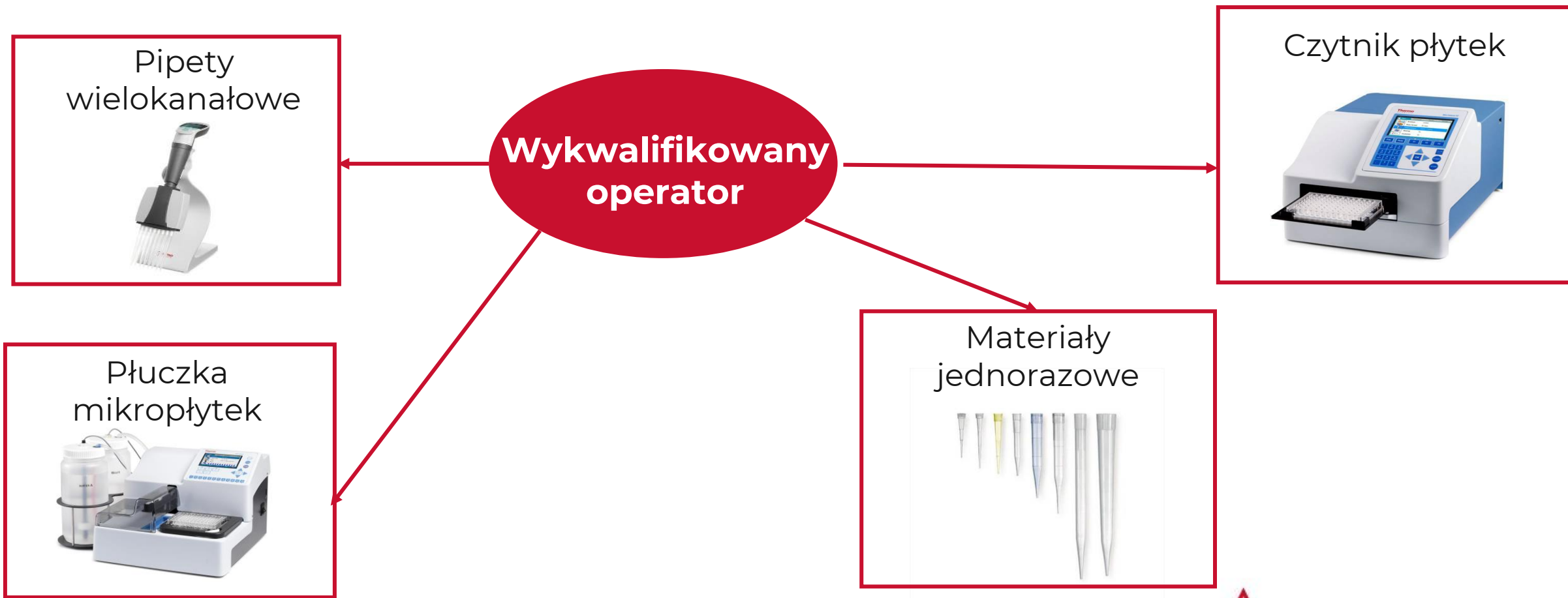
## Interpretacja wyników

- walidacja
- obliczanie
- matryce





# Jak usprawnić wykonywanie testów ELISA?



ARGENTA

# Dlaczego warto wybrać technikę ELISA?

- Dostępna dla każdego białka alergenu (z wyjątkiem selera) i każdego rodzaju mykotoksyn.
- Uznawana jako referencyjna i pierwszego wyboru do oznaczania glutenu w żywności bezglutenowej.
- Dla mykotoksyn stosowana jako metoda skreeningowa.
- Wyniki jakościowe jak i ilościowe.
- Wysoka czułość w stosunku do próbek żywności.
- Dostępna szeroka gama testów o różnej kombinacji czułości, zakresu badania i czasu potrzebnego na wykonanie analizy.
- Automatyzacja badania pozwala na dużą powtarzalność wyników i skraca czas wykonania oznaczenia.



ARGENTA

# Testy ELISA – warto wiedzieć, że...

- Mogą występować reakcje krzyżowe.
- Próbki o silnym zabarwieniu utrudniają właściwe odczytanie wyniku końcowego w spektrofotometrze.
- Możliwe wyniki fałszywie ujemne przy badaniu żywności wysoce przetworzonej.
- Każdy alergen wymaga osobnego testu.
- Koszt analizy silnie uzależniony od liczby badanych próbek.
- Wymagają wykwalifikowanego personelu, dobrze wyposażonego laboratorium oraz wysokich standardów czystości.





**Testy LFT**

# Testy immunologiczne przepływu bocznego - LFT

Test przepływu bocznego (Lateral Flow Test, LFT) jest również znany jako test paskowy immunochromatograficzny bocznego przepływu.

Służy do celów diagnostycznych w zastosowaniach medycznych, weterynaryjnych, czy badaniu żywności. Jest to prosty test używany do wykrywania docelowego analitu w próbce bez żadnego specjalistycznego sprzętu, chociaż może być wspierany przez specjalistyczny sprzęt (czytnik).

Może być stosowany do specyficznego ilościowego lub jakościowego wykrywania wielu analitów, takich jak przeciwciała, antygeny, toksyny i produkty amplifikacji kwasów nukleinowych.

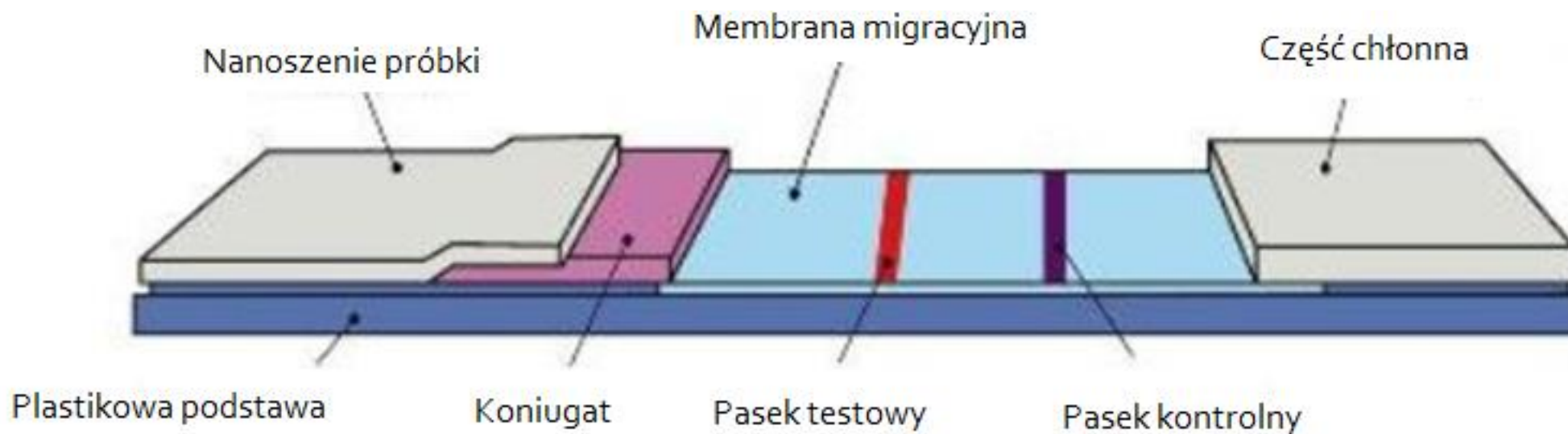


ARGENTA



# Testy LFT - budowa

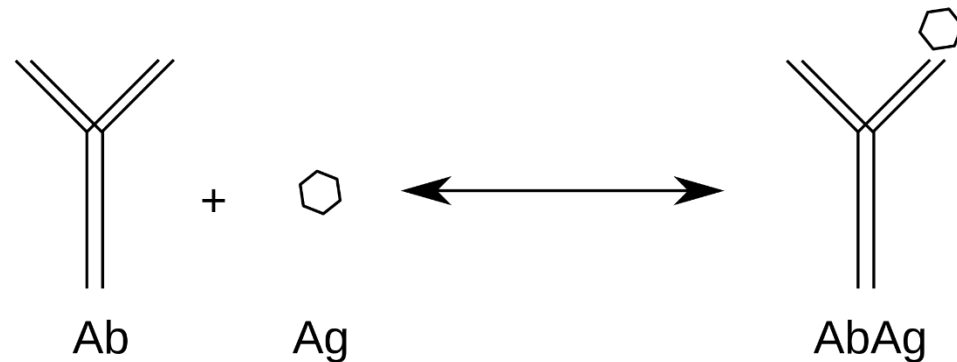
- Występują najczęściej w formie paska lub płytek
- Wewnątrz znajduje się pasek składający się z czterech części
- Na powierzchni znajdują się: okienko do nanoszenia kropli badanej substancji, linia kontrolna (która pojawia się, gdy test działa poprawnie) oraz linia badana.



ARGENTA

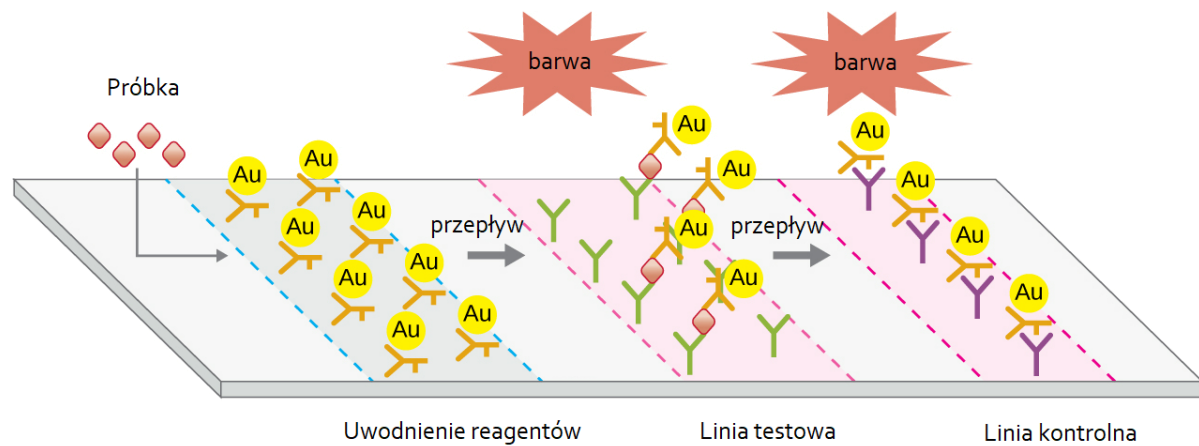
# Testy LFT – zasada działania

- Zasada działania testów LFT i ELISA jest podobna. Różnica polega na tym, że reakcja immunologiczna w testach LFT przebiega na membranie z wykorzystaniem zjawisk kapilarnych, a w testach ELISA – na płytce z 96 dołkami (pełniącymi funkcję mikroprobówek), opłaszczonymi przeciwciałem lub antygenem, w zależności od rodzaju testu.

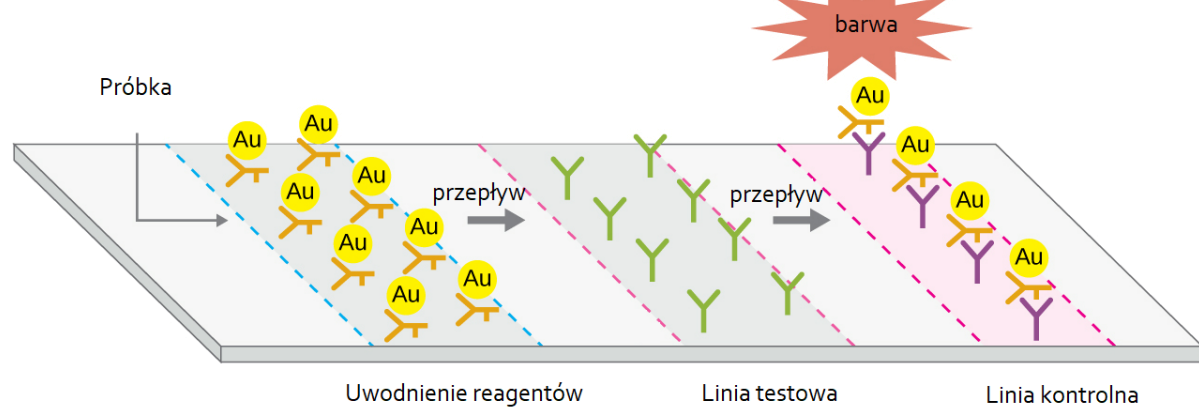


# Testy LFT – zasada działania

Wynik dodatni

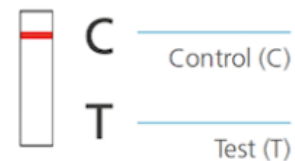


Wynik ujemny



Y przeciwciała      ● wykrywana substancja      Au kompleks przeciwciała-Au      Y przeciwciała kontrolne

## Test results



**Negative result**



**Positive results**

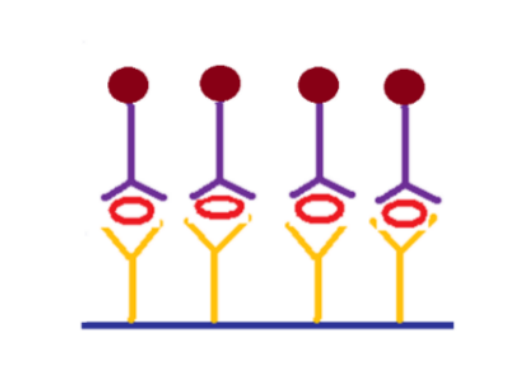


**Results void**



# Testy immunologiczne przepływu bocznego - LFT

- Najbardziej znane są te przeznaczone dla najpowszechniej występujących białek alergennych: glutenu, białek mleka, jaj czy orzechów oraz mykotoksyn.
- Często występuje podział na testy dedykowane konkretnym matrycom: jedne dla wymazów z powierzchni, inne dla produktów, a jeszcze inne specjalnie dla trudnych matryc.
- W zasadzie stosowane do analiz jakościowych - jest/nie ma - z uwzględnieniem wartości LOD.



# Testy LFT - wskazówki

- Zaleca się sprawdzić działanie testu z danym typem próbki żywności, przed przystąpieniem do wykonania testu z próbkami właściwymi.
- Przygotowanie próbek niektórych wysoko przetworzonych produktów np. pieczywa o bardzo niskiej zawartości glutenu, herbatników, makaronu jest utrudnione, a ilość np. glutenu możliwa do wykrycia w takich próbkach, może być większa niż 10-20 ppm.





# Testy LFT - wskazówki

Wykonanie testu LFT jest dużo szybsze i prostsze, niż testu techniką ELISA, i nie wymaga tak dobrze wyposażonego laboratorium, niemniej potrzebne jest staranne dobranie testu pod kątem badanej matrycy.

Na pewno jest to dobre narzędzie do monitorowania powierzchni produkcyjnych oraz sprawdzania efektywności czyszczenia linii produkcyjnych.



ARGENTA

# Testy LFT - zalety

- Łatwe do stosowania. Szczególnie do badań środowiskowych.
- Wygodne do pojedynczych próbek. Nie zużywa się odczynników na wykonanie standardów.
- Dużo szybciej uzyskiwany wynik. Czas wykonania samego testu to kilka do kilkunastu minut.
- Nie wymagają specjalnego wyposażenia. Odczyt można wykonać „gołym okiem”.
- Możliwość zastosowania czytników i wykonania odczytu ilościowego
- Niepotrzebny jest szczególnie wykwalifikowany personel.
- Nie wymaga tak dobrze wyposażonego laboratorium.



ARGENTA

# Testy LFT – warto wiedzieć, że...

- Możliwe reakcje krzyżowe.
- Niepełna gama alergenów.
- Możliwe „przeładowanie”, które powoduje fałszywie ujemne wyniki.
- Konieczne staranne dobranie testu do badanej matrycy.
- Wyniki zależne od podatności matrycy na ekstrakcję, rozpuszczalność i immunoreaktywność.
- Wrażliwe na stopień i rodzaj obróbki matrycy (dla próbek żywności) - fermentacja, hydroliza, temperatura
- Czułość niższa niż testów ELISA.



ARGENTA

# Metoda PCR





# Technika PCR

- Do lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia komercyjnie dostępne testy do badania alergenów opierały się wyłącznie na zasadzie immunologicznej.
- W ostatnich latach technika PCR, podobnie jak w badaniach mikrobiologicznych żywności, weszła do użycia również w obszar badania alergenów.
- Jej zasada polega na wykrywaniu alergenów na podstawie identyfikacji fragmentów DNA kodujących syntezę alergennych białek.
- Może być stosowana np. do wykrywania obecności orzeszków ziemnych, gorczycy, sezamu, pistacji, migdałów, orzechów makadamia, łubinu oraz selera.



# Technika PCR – zalety

- Wysoka czułość i specyficzność.
- Do oznaczeń jakościowych i ilościowych.
- Znajduje zastosowanie do wykrywania alergenów w produktach, w których nie można użyć techniki ELISA, np. selera.
- Metoda nadaje się do żywności wysoko przetworzonej.
- Pozwala wykryć bardzo małe ilości alergenów w krótkim czasie.
- Implementacja metody daje duże możliwości innych analiz.





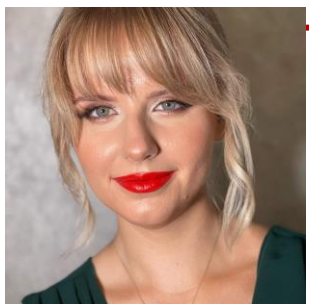
# Technika PCR – warto wiedzieć, że...

- Jest metodą pośrednią – wykrywa DNA kodujące syntezę alergennych białek.
- Można uzyskać wynik dodatni, mimo rozłożenia białka alergennego w procesie produkcji.
- Wyższe koszty, potrzeba posiadania zaawansowanego sprzętu laboratoryjnego oraz wykwalifikowanego personelu.



ARGENTA

# Dziękuję za uwagę!



**Marta Koziel**

**e:** [m.koziel@argenta.com.pl](mailto:m.koziel@argenta.com.pl)

**m:** 506 381 531