

RIVM rapport 340330002/2005

Methoden om allergenen in voedsel te detecteren

J. Ezendam, M. Bremer* en H. van Loveren

Contact: H. van Loveren

Laboratory for Toxicology, Pathology and Genetics
(TOX)

E-mail: H.van.loveren@rivm.nl

* RIKILT-Instituut voor Voedselveiligheid

Cluster Biomoleculaire Detectie

Postbus 230

6700 AE Wageningen

Monique.Bremer@wur.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van de Voedsel en Waren Autoriteit (VWA/KvW), in het kader van project V340330 Voedselallergie

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, telefoon: 31 30 274 2971

ABSTRACT

Methods to detect allergens in food

Currently it is not well possible to control correctness of product-information concerning the content of food allergens in food products. From November 1, 2005, EU legislation requires labeling of content of food allergens in food products. Methods to detect food allergens in food are available, but for the purpose of control of adequate labeling, threshold values need to be known, in order to set criteria for methods in terms of sensitivity. Such threshold values are largely unknown.

An additional problem is posed by novel foods. Novel foods may contain new or hitherto unknown allergens. Currently it is difficult to predict potential allergenicity of these proteins.

food allergy, threshold values, labeling, detection methods, EU legislation

RAPPORT IN HET KORT

Methoden om allergenen in voedsel te detecteren

Het is nog niet mogelijk om de verplichte informatie-etikettering van voedingsproducten goed te handhaven. Vanuit Europese regelgeving geldt per 1 november 2005 de verplichting om de aanwezigheid van allergie opwekkende stoffen (allergenen) op de etiketten van voedingsproducten te vermelden. Om dit beleid goed te handhaven moet bekend zijn hoeveel allergenen een mens binnen mag krijgen voordat er een allergische reactie optreedt. Zonder deze gegevens is het wel mogelijk om de aanwezigheid van allergenen in voedsel aan te tonen, maar onmogelijk om precies aan te geven of dit een allergische reactie tot gevolg heeft. Alleen als het risico voor een allergische reactie bestaat is handhaving van belang.

Een extra factor om rekening mee te houden in allergenen onderzoek, zijn nieuw ontwikkelde soorten voeding ('novel foods'). Er kan bij deze voeding sprake zijn van nieuwe of onbekende eiwitten. Nu is nog moeilijk te voorspellen of deze eiwitten allergie opwekken.

voedselallergie, drempelwaarden, etikettering, detectiemethoden, EU legislation

INHOUD

SAMENVATTING	4
1 INTRODUCTIE	6
2 DETECTIE METHODEN VOOR VOEDSEL-ALLERGENEN	8
2.1 IMMUNOASSAYS	8
2.2 POLYMERASE CHAIN REACTION	13
2.3 OVERIGE METHODIEKEN	14
3 DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN ALLER-GENEN IN VOEDING.....	16
3.1 GRAAN	16
3.2 SCHAALDIEREN	17
3.3 EIEREN	18
3.4 VIS	19
3.5 PINDA	20
3.6 MELK EN ZUIVELPRODUCTEN.....	24
3.7 SOJA	25
3.8 NOTEN.....	26
3.9 SESAMZAAD	29
3.10 SELDERIE.....	30
3.11 MOSTERD.....	30
3.12 SULFIET.....	31
4 EXPERTISE IN NEDERLAND	32
5 BEOORDELING VAN “NOVEL FOODS” OP MOGELIJKE ALLERGENICITEIT..	33
6 CONCLUDERENDE OPMERKINGEN	36
DANKBETUIGING.....	37
REFERENTIES	38

SAMENVATTING

De Europese Unie schrijft voor dat voedingsproducten die de belangrijkste voedselallergenen bevatten dit moeten vermelden bij de productinformatie op het etiket (Directive 2003/89/EC, Annex IIIa). Producten die de volgende ingrediënten bevatten moeten gelabeld worden: granen (inclusief gluten), schaaldieren, eieren, vis, pinda, melk (inclusief lactose), soja, noten, sesamzaad, selderie, mosterd en sulfiet. Het betreft hier de belangrijkste allergenen die verantwoordelijk zijn voor meer dan 90% van de gevallen van voedselallergie, met uitzondering van lactose en sulfiet, die geen allergie veroorzaken. Lactose, een suiker, veroorzaakt in gevoelige patiënten lactose intolerantie. Sulfiet kan in gevoelige personen astmatische reacties veroorzaken die niet immunologisch gemedieerd zijn.

Voor een accurate etikettering van producten zijn gevoelige en betrouwbare detectiemethoden nodig. Om allergenen te bepalen in voeding zijn immunoassays (bijvoorbeeld enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA's)), moleculair-biologische methoden (polymerase chain reaction (PCR) methoden) en analytische methoden (bijvoorbeeld vloeistof chromatografie) beschreven. Lactose en sulfiet zijn geen eiwitten en voor de detectie van deze twee verbindingen wordt gebruik gemaakt van analytische methoden.

Hoewel er voor alle te etiketteren voedselallergenen detectiemethoden gepubliceerd of commercieel verkrijgbaar zijn, zijn slechts een paar methoden daadwerkelijk gevalideerd in interlaboratoriumstudies. Commerciële kits lijken voor routinegebruik het meest geschikt omdat deze verkrijgbaar en relatief eenvoudig toepasbaar zijn. Echter deze commerciële kits kunnen pas als volwaardig worden beschouwd wanneer ze gevalideerd zijn in een interlaboratoriumstudie. Bij de validatie van testen zijn gevoeligheid en specificiteit belangrijk. Voor de toepasbaarheid van een test is het vaststellen van een drempelwaarde essentieel. Hiervoor zijn momenteel echter nog onvoldoende klinische gegevens voorhanden. Voor hazelnoot, koemelk, eieren, vis, schaaldieren, selderie, sesamzaad, soja en mosterd zijn er wel methoden beschreven of commercieel beschikbaar, echter geen van deze methoden is voldoende gevalideerd. Om in de toekomst een voedingsmiddel op een snelle en efficiënte manier op alle te etiketteren voedselallergenen te kunnen onderzoeken, is het ontwikkelen van multi-analyte detectiemethoden onontbeerlijk.

In de meeste genetisch gemodificeerde planten worden nieuwe eiwitten tot expressie gebracht. De zorg bestaat dat deze nieuwe eiwitten potentiële allergenen kunnen zijn. Om allergeniteit van 'novel foods', zoals voeding afkomstig van genetisch gemodificeerde organismen, vast te stellen is een beslisboom opgesteld door de Food Agricultural Organization samen met de World Health Organization. Potentiële allergeniciteit wordt

beoordeeld door vast te stellen of de bron van het nieuw tot expressie gebrachte eiwit allergeen is en of er sequentiehomologie is met bekende allergenen. Vervolgens wordt met serumscreens gekeken naar IgE-binding door gebruik te maken van serum van individuen met voedselallergie. Verder wordt een eiwit nog onderzocht op weerstand tegen pepsine afbraak en kan het nog getest worden in diermodellen.

1 INTRODUCTIE

Voedselallergie is een belangrijk gezondheidsprobleem in de Westerse wereld dat voorkomt bij 1-3% van de volwassenen en bij 4-6% van de kinderen. De allergie is een gevolg van een abnormale immunologische reactie gericht tegen eiwitten in voeding of een voedselcomponent en wordt gemedieerd door allergeen-specifiek IgE. Klinische verschijnselen die kunnen optreden variëren van milde tot fatale reacties en kunnen in verschillende organen optreden. Voorbeelden van klinische effecten zijn het oraal allergie syndroom, gekenmerkt door jeuk en zwelling van de mond, digestieve problemen zoals braken en diarree, respiratoire aandoeningen zoals astma, circulatieproblemen zoals oedeem en huidreacties zoals urticaria en atopisch eczeem en systemische anafylactische reacties, die levensbedreigend kunnen zijn. In kinderen zijn pinda's, melk en eieren vaak de oorzaak van voedselallergie, terwijl in volwassen pinda's, noten, vis, schaaldieren en fruit vaak allergische reacties veroorzaken. De intrinsieke capaciteit van voedselallergenen om allergische reacties op te wekken verschilt en vooral melk, pinda, sesamzaad en garnalen zijn zeer allergeen (Metcalf 1985; Sampson 2004; Sicherer 2002).

Er is momenteel geen behandeling voor voedselallergie en de enige manier om allergische reacties te voorkomen is vermijden van voeding die het allergeen bevat. Dit is echter niet altijd eenvoudig omdat veel voedingsmiddelen kleine hoeveelheden “verborgen” voedselallergenen kunnen bevatten, bijvoorbeeld in additieven (E-nummers), aroma's, vitamines, kruiden of specerijen. Een bekend voorbeeld is soja als onderdeel van aroma's. Voeding kan bovendien gecontamineerd raken tijdens de bereidingsfase of door overdracht via niet goed schoongemaakte of gedeelde apparatuur.

Om allergische reacties te voorkomen is betrouwbare etikettering van producten dus essentieel. De Europese Unie heeft regelgeving uitgevaardigd (European Food Labelling Directive 2000/13/EC), waarin staat welke ingrediënten vermeld moeten worden op producten. Deze lijst (Annex IIIA van Directive 2003/89/EC) bevat allergenen die verantwoordelijk zijn voor meer dan 90% van de gevallen van voedselallergie (European Commission 2000) en is in overeenstemming met de lijst die is samengesteld door de Codex Alimentarius Commissie (1999) en de Amerikaanse Food and Drug Administration (FDA) (2001). Producten die de volgende ingrediënten bevatten moeten gelabeld worden:

- graan en producten daarvan (inclusief gluten)
- schaaldieren en producten daarvan
- eieren en producten daarvan
- vis en producten daarvan
- pinda en producten daarvan

- melk- en zuivelproducten (inclusief lactose)
- soja en producten daarvan
- noten en producten met noten
- sesamzaad en producten daarvan
- selderie en producten daarvan
- mosterd en producten daarvan
- sulfiet

De etikettering geldt voor alle afgeleide producten en derivaten van de bovengenoemde allergenen, behoudens een klein aantal uitzonderingen. De lijst van voedselingredienten of stoffen die tijdelijk niet geëtiketteerd hoeven worden is gepubliceerd als richtlijn 2005/26/EG. Verder geldt de etiketteringrichtlijn niet voor niet-voorverpakte levensmiddelen en mogelijke kruisbesmetting met allergenen. Ondertussen zijn verzoeken ingediend ter aanvulling van de lijst met allergene stoffen die geëtiketteerd moeten worden. Het betreft weekdieren, fructose en lupine.

Naast de in de lijst genoemde voedselallergenen zijn er nog veel meer voedselallergenen (>160) geïdentificeerd, onder andere fruit en groente. Dit rapport zal zich echter beperken tot de voedselallergenen die zijn beschreven in bovenstaande lijst.

Sulfiet en lactose zijn geen eiwitten en ook geen echte allergenen omdat ze geen reacties veroorzaken die door het immuunsysteem gemedieerd worden. Ze zullen echter wel in dit rapport behandeld worden. Sulferende stoffen staan in bovenstaande lijst, omdat ze in voeding aanwezig kunnen zijn en in gevoelige personen astmatische reacties veroorzaken. Lactose veroorzaakt in gevoelige personen lactose-intolerantie.

Voor accurate etikettering van producten zijn betrouwbare en gevoelige methoden nodig om voedselallergenen te detecteren. De gevoeligheidseisen die gesteld moeten worden aan detectie methodieken hangen af van de drempelwaarde van het allergeen. In RIVM rapport 340330001 (Van Loveren en Ezendam, 2006) zullen drempelwaarden van voedselallergenen uitgebreid besproken worden. Uit dit rapport blijkt dat voor de meeste allergenen in bovenstaande lijst drempelwaarden nog niet formeel zijn vastgesteld, omdat beschikbare gegevens daartoe niet toereikend zijn.

In dit rapport zullen methodieken die beschreven zijn in de literatuur of die commercieel verkrijgbaar zijn voor elk voedselallergeen beschreven worden. Indien aanwezig zal informatie worden gegeven over gevoeligheid en validatie van de methoden. Daarnaast zal in dit rapport aandacht geschonken worden aan de bepaling van allergeniciteit van 'novel foods', zoals genetisch gemodificeerde voedingsmiddelen. Deze 'novel foods' bevatten vaak nieuwe eiwitten waarvan niet bekend is of ze allergische reacties kunnen veroorzaken. Deze producten worden beoordeeld met behulp van een beslisboom die zal worden besproken in dit rapport.

2 DETECTIE METHODEN VOOR VOEDSEL-ALLERGENEN

De eiwitten die de allergische reacties veroorzaken in voedingsmiddelen kunnen worden geïdentificeerd met behulp van serum van patiënten die allergisch zijn voor het betreffende voedingsmiddel. Dit serum bevat allergeen-specifiek IgE, dat bindt aan de allergische reactie veroorzakende eiwit(ten). Door deze binding zichtbaar te maken, bijvoorbeeld door immunoblotting, kunnen de allergene eiwitten geïdentificeerd worden.

Met antilichamen opgewekt tegen deze allergene eiwitten kunnen immunoassays ontwikkeld worden waarmee de allergenen in voedsel aangetoond kunnen worden. Voor veel voedselallergenen zijn inmiddels enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA's) ontwikkeld en ook commercieel verkrijgbaar.

Andere analyse methoden die toegepast worden zijn moleculair biologische technieken zoals polymerase chain reaction (PCR), waarbij DNA in plaats van het allergene eiwit zelf wordt gedetecteerd (voor overzichtsartikelen zie: Besler 2001; Poms et al. 2004b). Er zijn commerciële PCR kits verkrijgbaar voor een aantal voedselallergenen. Daarnaast worden verschillende analytische methoden beschreven in de literatuur zoals vloeistof-chromatografie (HPLC), gas-chromatografie (GC) en massa-spectrometrie (MS).

2.1 IMMUNOASSAYS

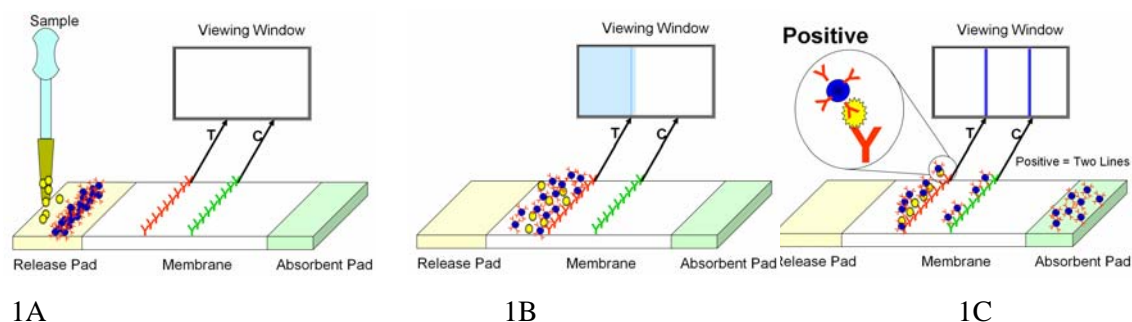
Voor de detectie van allergenen zijn verschillende immunoassays beschreven in de literatuur. Rocket-immuno-electrophoresis (RIE), lateral flow devices (LFD), dipsticks, en immunoblotting zijn kwalitatieve methoden en radio-allergosorbent test (RAST), enzyme-allergosorbent test (EAST), biosensorassays, flow cytometrische methoden en enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), zijn (semi)-kwantitatieve methoden. De ELISA is momenteel de enige methode die gebruikt wordt in routineanalyse van voedsel, omdat deze methode nauwkeurig, simpel uitvoerbaar, goed te standaardiseren en voor de meeste voedselallergenen beschikbaar is (Poms et al., 2004b).

Voor de detectie van voedselallergenen wordt meestal gebruikt gemaakt van een sandwich ELISA. Het "capture" antilichaam, gericht tegen een allergeen eiwit/eiwitten, wordt gebonden aan een vaste drager, meestal een microtiterplaat. Hierna wordt een extract van het te analyseren sample toegevoegd en de hierin aanwezige specifieke eiwitten zullen aan het "capture" antilichaam binden. Vervolgens wordt een tweede enzym gelabeld antilichaam

toegevoegd dat specifiek bindt aan het reeds aan het “capture” antilichaam gebonden eiwit. De hoeveelheid gebonden gelabeld antilichaam kan zichtbaar gemaakt worden door toevoeging van een substraat dat door het enzym omgezet wordt in een gekleurd product. Na stoppen van de enzymreactie kan de concentratie van het gevormde product spectrofotometrisch bepaald worden. De absorptie van het gevormde product is proportioneel aan de concentratie allergeen eiwit in het geanalyseerde monster. Door absorpties van monsters met die van een set van standaarden met bekende gehalten aan allergeen te vergelijken kan kwantitatief de allergeen concentratie in het originele monster bepaald worden.

Voor de detectie van kleine eiwitten wordt meestal gekozen voor een competitieve ELISA in plaats van een sandwich ELISA. Het specifieke allergene eiwit/eiwitten wordt gebonden aan een vaste drager. Vervolgens worden enzym gelabeld antilichaam en het extract van het te analyseren monster tegelijk toegevoegd. Het allergene eiwit in het monster competeert met het op de vaste drager gebonden allergene eiwit voor de binding van het antilichaam. De hoeveelheid antilichaam gebonden aan het allergene eiwit op de vaste drager zal afnemen met toenemende concentratie van allergene eiwit in het monster. De hoeveelheid aan de vaste drager gebonden gelabeld antilichaam kan op dezelfde manier als bij de sandwich assay bepaald worden. In een competitieve assay is de concentratie gevormd product omgekeerd evenredig met de hoeveelheid allergeen eiwit in het monster, dat wil zeggen als het te analyseren monster veel van het specifieke eiwit bevat zal er weinig kleuring zijn en vice versa.

Als snel alternatief voor een ELISA zijn de laatste jaren immunochromatografische striptesten (lateral flow devices en dipsticks) in opkomst. Deze testen zijn een variant op de ELISA-techniek en zijn gebaseerd op laterale flowtechnologie, zie Figuur 1. In deze techniek zijn de capture antilichamen op een membraan gecoat in plaats van op een microtiterplaat en vindt detectie plaats met behulp van gekleurde bollen ipv een enzym. Deze striptesten zijn snel, goedkoop, vereisen een minimale training en zijn daarom uitermate geschikt voor veldtesten.



Figuur 1. Principe van een immunochromatografische striptes. Door opbrengen van het monster op de “release pad” stromen onder invloed van capillaire werking bolletjes gecoat met antilichamen gericht tegen het allergeen uit de “release pad” over het membraan (1A en 1B). Wanneer er allergeen in het monster aanwezig is zal op de test lijn (T) een sandwich gevormd worden tussen het antilichaam gecoat op het membraan, het allergeen in het monster en het antilichaam op de bollen (1C). Hierdoor wordt een gekleurde lijn zichtbaar in het venster. Op de controle lijn (C) zijn antilichamen gecoat die binden aan de antilichamen op de bolletjes. Een zichtbare lijn op deze positie geeft aan dat de bolletjes over het membraan gestroomd zijn en de test goed uitgevoerd is. Wanneer er alleen een gekleurde lijn op de controle positie zichtbaar is geeft dit aan dat er in het monster geen allergeen aanwezig was.

Momenteel zijn er commerciële ELISA-kits en dipsticks verkrijgbaar voor detectie van verschillende voedselallergenen. In Tabel 1 staat een overzicht van welke kits er beschikbaar zijn en wat de detectielimiet is volgens de fabrikant. De meeste van deze ELISA-kits zijn echter nog niet gevalideerd in een interlaboratorium validatie. Uitzonderingen zijn de ELISA's voor pinda eiwit van Neogen en Tepnel Biosystems, de Ara h1 ELISA van Pro-Lab Diagnostics en de gliadine ELISA van R-Biopharm (Poms et al., 2004b).

Voor detectie van allergenen kan ook gebruik worden gemaakt van biosensoren. Eén van de technieken om snelle analyses uit te kunnen voeren is gebaseerd op commercieel verkrijgbare geautomatiseerde meerkanaals surface plasmon resonance (SPR) biosensoren zoals BIACORE. Assays gebaseerd op SPR detectie meten de verandering in brekingsindex aan het sensoroppervlak veroorzaakt door binding van moleculen aan dit oppervlak. Deze assays zijn dus in principe gebaseerd op het meten van veranderingen in massaconcentratie aan het sensoroppervlak. In een directe SPR-biosensorassay wordt een sensorchip gecoat met antilichamen specifiek gericht tegen het te detecteren allergeen. Vervolgens wordt een extract van het te analyseren monster toegevoegd. De binding van het allergeen kan gevolgd worden in de tijd en door signalen van monsters met die van een set van standaarden met bekende gehalten aan allergeen te vergelijken kan kwantitatief de allergeenconcentratie in het originele monster bepaald worden.

Voordelen zijn dat voor SPR biosensoren geen gelabelde antilichamen nodig zijn, (vaak) meerdere assays tegelijkertijd uitgevoerd kunnen worden, de detectie gevolgd kan worden in de tijd, een analyse slechts een aantal minuten duurt en de techniek grotendeels

geautomatiseerd kan worden. Deze techniek is in het verleden onder andere toegepast om vervuiling van melkpoeder met eiwitten van soja, erwt of granen te detecteren (Haasnoot et al., 2001), maar wordt tegenwoordig ook gebruikt voor detectie van voedselallergenen.

Ook met een op fluorescente microspheres gebaseerde flow cytometrische methode kunnen meerdere stoffen in één assay worden gemeten. Door de combinatie van de Luminex 100 flow analyser en de MultiAnalyte Profiling (XMAP) technologie kunnen simultaan tot 100 verschillende assays per monster geanalyseerd worden. Deze methode wordt al veel toegepast voor het meten van cytokines, maar zal in de toekomst wellicht ook worden gebruikt voor het meten van voedselallergenen. Het verschil met een ELISA is dat in deze assay specifieke antilichamen niet aan een microtiterplaat worden gekoppeld, maar aan fluorescerende bolletjes. Ieder bolletje is gecoat met een specifiek antilichaam en heeft zijn eigen fluorescentiespectrum. Op deze manier kunnen verschillende antilichamen en dus gedetecteerde allergenen van elkaar onderscheiden worden. Extracten van de te analyseren monsters worden toegevoegd aan de bolletjes en zullen binden aan de verschillende antilichamen. Hierna worden specifieke detectie-antilichamen toegevoegd waaraan een fluorescent label is gekoppeld. Met een Luminex flow analyser kan de fluorescentie van de bolletjes en de fluorescentie van de detectie-antilichamen worden gemeten, waarbij de laatste een maat is voor de hoeveelheid allergeen eiwit in het geanalyseerde monster.

Tabel 1. Commercieel verkrijgbare ELISA test kits om allergenen te detecteren in voedsel*

Allergisch voedsel	Target	ELISA type	LOD	Leverancier
Amandel	amandel proteïne	kwantitatieve sandwich	<2.5	Neogen
	amandel proteïne	kwantitatieve sandwich	<5	Neogen
Schaaldieren	tropomyosine	kwantitatieve sandwich	1	Elisasystems
Ei	ovomucoid en ovalbumine	kwantitatieve sandwich	1	Elisasystems
	ei proteïne	kwantitatieve sandwich	0.3	Pro-Lab Diagnostiscs
	eiwit proteïne	kwantitatieve sandwich	2	R-Biopharm
	ei proteïne	kwantitatieve sandwich	<2.5	Neogen
Hazelnoot	ei proteïne	kwalitatieve sandwich	<5	Neogen
	hazelnoot proteïne	kwantitatieve sandwich	1	Elisasystems
Melk	hazelnoot proteïne	kwantitatieve sandwich	10	R-Biopharm
	β-lactoglobuline en caseïne	kwantitatieve sandwich	1	Elisasystems
Melk	caseïne	kwantitatieve competitieve	<5	Tepnel Biosystems
	BSA	kwantitatieve competitieve	<5	Tepnel
	β-lactoglobuline	kwantitatieve competitieve	<5	Tepnel
	β-lactoglobuline	kwantitatieve competitieve	5	R-Biopharm
	caseïne	kwantitatieve sandwich	<2.5	Neogen
	caseïne	kwalitatieve competitieve	<5	Neogen
	Sesam	2S albumine	kwantitatieve sandwich	1
sesam proteïne		kwantitatieve sandwich	<1	Tepnel
Pinda	Ara h2	kwantitatieve sandwich	1	Elisasystems
	pinda proteïne	kwantitatieve sandwich	1.6	Pro-Lab
	Ara h1	kwantitatieve sandwich	<0.1	Tepnel
	pinda proteïne	kwantitatieve sandwich	2	R-Biopharm
	pinda proteïne	kwantitatieve sandwich	<2.5	Neogen
	pinda proteïne	kwalitatieve sandwich	<5	Neogen
	pinda proteïne	kwalitatieve dipstick	<5	Neogen
Soja	Ara h1	kwalitatieve dipstick	<10	Tepnel
	soja trypsine inhibitor	kwantitatieve sandwich	1	Elisasystems
Gluten	soja proteïne	kwantitatieve competitieve	<5000	Tepnel
	gliadine	kwantitatieve sandwich	<2	Tepnel
	gliadine	kwantitatieve sandwich	1.5	R-Biopharm
	gliadine	kwalitatieve dipstick	10	R-Biopharm
	gliadine	kwalitatieve dipstick	<10	Tepnel

*Tabel overgenomen uit review van Poms et al., 2004

LOD = limit of detection; detectielimiet volgens de fabrikant, in ppm (mg per kg voedsel).

2.2 POLYMERASE CHAIN REACTION

Met behulp van polymerase chain reaction (PCR) wordt geen eiwit gedetecteerd maar DNA. PCR-methoden worden veelvuldig gebruikt om microbiële pathogenen en genetisch gemodificeerd materiaal in voedsel aan te tonen. De methode maakt gebruik van primers die specifiek zijn voor een DNA fragment. Dubbelstrengs DNA geïsoleerd uit het voedsel wordt gesplitst zodat de primers kunnen hechten aan de twee losse strengen. Vervolgens wordt aan beide strengen nieuw specifiek complementair DNA geamplificeerd met behulp van DNA polymerase. Dit proces wordt een aantal cycli herhaald zodat het DNA fragment in voldoende hoeveelheid geamplificeerd is om gedetecteerd te worden met agarose gel electroforese. Deze PCR methode is kwalitatief of semi-kwantitatief.

Het principe van real-time PCR is gelijk aan “normale” PCR, maar de hoeveelheid geamplificeerd product per cyclus wordt gedurende de hele PCR gemeten met behulp van fluorescentie. Dus het geamplificeerde DNA wordt in “real time” gedetecteerd, terwijl in de “normale” PCR DNA pas wordt gemeten nadat alle cycli doorlopen zijn (eindpuntmeting).

Een DNA-ELISA of PCR-ELISA combineert PCR met ELISA. Geamplificeerd DNA wordt gekoppeld aan specifiek DNA waaraan een eiwit gebonden is. Hierna wordt een antilichaam toegevoegd dat specifiek bindt aan dit eiwit. Dit antilichaam is gelabeld met een enzym en kan na toevoeging van het substraat gevisualiseerd worden. De hoeveelheid DNA is proportioneel aan het gekleurde product dat ontstaat. Real-time PCR en PCR-ELISA zijn kwantitatieve methodes.

*Tabel 2. Commercieel verkrijgbare PCR test kits om allergenen te detecteren in voedsel**

Allergenic food	Target	Method	LOD
Amandel	<i>Amygdalys communis</i> DNA	PCR	<10
	DNA	DNA-ELISA	<10
	DNA	real-time PCR	<10
Selderie	<i>Apium graveolens</i> DNA	PCR	<5
Mosterd	<i>Brassica sinapus alba</i> DNA	PCR	<5
Hazelnoot	<i>Cor a 1.0401</i> gen	DNA-ELISA	<10
		real-time PCR	<10
Pinda	DNA	PCR+gel electroforese	<10
	DNA	DNA ELISA	<10
	DNA	real-time PCR	<10
Soja	lectine gen	DNA-ELISA	<10
	lectine gen	real-time PCR	<10
Gluten	Glutelin of prolamin	PCR	<5

*Tabel overgenomen uit review van Poms et al., 2004 en aangevuld met recente informatie van leveranciers (www.congen.de; www.tepnel.com). LOD = limit of detection; detectielimiet volgens de fabrikant in het aantal kopieën ppm

Momenteel zijn er een aantal PCR kits op de markt (Tabel 2), die verkrijgbaar zijn bij Congen GmgH en Tepnel Biosystems Ltd. De sequentie van het target DNA is niet altijd gespecificeerd door de leveranciers. De gevoeligheid van een assay wordt meestal niet uitgedrukt in ppm, maar in aantal kopieën dat nodig is om het product te kunnen meten. Deze gevoeligheid ligt meestal tussen de 5 en 50 kopieën en hiermee kan ongeveer 5 tot 50 ppm allergen gedetecteerd worden. Meestal kan met PCR alleen kwalitatief gemeten worden of voedsel DNA van een allergen bevat. De PCR methode lijkt geschikt om op een indirecte manier allergenen te detecteren, want er wordt geen eiwit gedetecteerd maar DNA (Poms et al., 2004a).

2.3 OVERIGE METHODIEKEN

In de literatuur zijn naast immunoassays en PCR methoden nog een aantal andere methodieken beschreven voor detectie van eiwitten, zoals vloeistof en gaschromatografie (HPLC, GC) en massaspectrometrie (MS). Chromatografie is een methode waarbij eiwitten in het te onderzoeken voedsel worden gescheiden. Ieder molecuul heeft zijn eigen karakteristieke chromatogram. Vervolgens wordt het chromatogram van het te onderzoeken voedsel vergeleken met bekende referentiestoffen. Massaspectrometrie is een techniek om een molecuul te identificeren aan de hand van zijn molecuulmassa. Deze analytische technieken zijn voor enkele voedselallergenen toegepast, zoals soja (Garcia et al., 1998) en pinda (Shefcheck en Musser, 2004). Voor de detectie van allergenen worden deze methoden minder vaak gebruikt dan immunoassays of PCR-methoden, omdat hiervoor een gespecialiseerd lab nodig is met benodigde apparatuur en expertise. Deze analytische methoden worden wel veel gebruikt om lactose te detecteren in voeding. Voor de detectie van gluten wordt ook gebruik gemaakt van chemisch-analytische methoden.

Er zijn ook assays beschreven die gebaseerd zijn op functionele responsen van cellen die betrokken zijn bij allergische reacties. Een voorbeeld hiervan is een methode die is beschreven om pinda in voeding te detecteren. In deze assay werd gebruik gemaakt van basofiele granulocyten, cellen die functioneel lijken op mucosale mestcellen. Het principe van deze assay is als volgt: de cellen worden opgeladen met IgE specifiek gericht tegen pinda. Hierna worden de monsters toegevoegd, en als deze pinda bevatten zal pinda met IgE op de mestcel cross-linken en vindt degranulatie plaats. Als maat voor degranulatie wordt met behulp van een kit α -hexosaminidase bepaald, één van de mediators die ook tijdens een allergische reactie vrijkomt uit mestcellen.

Tabel 3: Vergelijking ELISA en PCR voor detectie en kwantificatie van voedselallergenen*

Aspecten		ELISA, dipstick		real-time PCR, PCR-ELISA
Detectie	+	Allergeen, mix van potentiële allergene eiwitten, of mix van eiwitten	+	DNA fragment
Specificiteit	+/-	Kruisreactiviteit is mogelijk	+	Species-specifiek DNA fragment
Gevoeligheid	+	Lage ppm range, matrix afhankelijk	+	In theorie 5-50 moleculen, matrix afhankelijk, lage ppm range
Kwantificatie	+	Directe specifieke eiwit kwantificatie	+/-	Aantal genoom kopieën correleert met hoeveelheid eiwit
Natuurlijke variabiliteit target	-	Resultaten kunnen verschillen door species verschillen, klimaat en seizoensveranderingen	+	Genotype is stabiel dan fenotype
Matrix effect	+/-	Kleine veranderingen in protocol kunnen extractie significant verbeteren	-	In voedsel zijn veel PCR remmers aanwezig (bewerkelijke en dure extracties nodig)
Bereiding voedsel				
- Temperatuur	+/-	Gedenatureerde of enzymatisch gemodificeerde eiwitten (met potentieel nieuwe epitopen) kunnen misschien niet gedetecteerd worden	+/-	DNA is relatief stabiel tegen hoge temperatuur (<120°C) maar wordt gefragmenteerd door lage pH (<4), fysische kracht en enzymatische degradatie
- Druk	-		+	
- pH	+/-		-	
- Gisting	+/-		-	
Standaarden/referentie materiaal	+/-	Nog niet verkrijgbaar	+/-	Nog niet verkrijgbaar
Bereiding monsters	+	Makkelijk en snel	-	Kan arbeidsintensief zijn
Tijdsduur	+	0.5 - 3.5 uur	-	2-6 h
Handelingen	+	Simpel	+/-	Training in DNA handelingen nodig
Stabiliteit reagentia	+/-	Enkele maanden bij 4°C	+	Enkele jaren bij -20°C
Kosten kits	+/-	4.5-10 euro	+/-	4.7-6.7 euro
Infrastructuur	+	Microtiterplaat reader	-	Thermocycler en microtiterplaat reader of Lightcycler/Taqman
Verkrijgbaarheid kits	+	Meerdere leveranciers	+/-	Twee leveranciers
Interlaboratorium validatie	+/-	Uitgevoerd voor enkele kits	-	Nog niet uitgevoerd

*Tabel overgenomen uit Poms et al. (2004).

+: positief kenmerk van de methode, +/-: neutraal kenmerk van de methode; -: negatief kenmerk van de methode.

3 DETECTIE EN KWANTIFICATIE VAN ALLERGENEN IN VOEDING

3.1 GRAAN

Karakteristieken allergie In graanproducten zoals tarwe, rogge, gerst en maïs, zijn eiwitten aanwezig die IgE-gemedieerde allergische reacties kunnen veroorzaken na inhalatie (bakkersastma) of ingestie (voedselallergie). De klinische symptomen die optreden na inname van graanproducten zijn vergelijkbaar met andere voedselallergieën en variëren van mild (orale allergie) tot ernstig (anafylactische reacties). Allergie voor granen komt in de gewone populatie weinig voor, maar bij kinderen veroorzaakt tarwe vaak allergische reacties. In tarwe, gerst en rogge is α -amylase inhibitor geïdentificeerd als belangrijk allergeen. Daarnaast zijn gliadinen, eiwitten verantwoordelijk voor coeliakie, ook geïdentificeerd als belangrijke allergenen in tarwe. Coeliakie wordt veroorzaakt door specifieke peptiden die aanwezig zijn in de gliadine fractie van tarwe gluten.

Meer aandacht gaat uit naar de detectie van gluten in graanproducten. Gluten zijn eiwitten die kunnen worden onderverdeeld in prolaminen en gluteninen. Prolaminen, en dan vooral gliadinen, veroorzaken gluten intolerantie of coeliakie. Dit is een auto-immuunziekte die wordt veroorzaakt door activatie van T cellen door gliadine, die schade en ontstekingen in de dunne darm veroorzaken. De prevalentie in Europa is ongeveer 1:200 en de ziekte kan alleen voorkomen worden door het volgen van een glutenvrij dieet.

Detectiemethoden Er is maar één sandwich ELISA beschreven waarbij monoklonale antilichamen gericht tegen tarwe α -amylase inhibitor werden gebruikt. Er zijn geen gegevens over kruisreactiviteit en detectielimiet want er zijn geen producten getest in deze assay (Yamashita et al., 2001).

Verschillende methoden zijn toegepast om gluten te detecteren, zoals SDS-PAGE gecombineerd met immunoblotting, massaspectrometrie en vloeistof chromatografie methoden. Om kleine hoeveelheden (ppm range) gluten te detecteren lijkt ELISA de meest geschikte methode (Poms et al., 2004b).

Een sandwich ELISA was ontwikkeld om gliadinen en andere eiwitten in gerst, rogge, tarwe en haver te detecteren. Hiervoor werden monoklonale antilichamen gericht tegen de verschillende granen gebruikt. Door twee monoklonale capture antilichamen en één detectie antilichaam te combineren konden verschillende prolaminen, waaronder gliadine uit gerst, rogge en tarwe worden gedetecteerd. De detectielimiet voor gliadinen was 1,5 ppm, inter-

assay variatie was 3-8% en intra-assay variatie was 4%. Deze ELISA werd vervolgens vergeleken met twee commercieel verkrijgbare ELISA kits van Transia en R-Biopharm, met detectielimieten van 80 en 10 ppm respectievelijk. De nieuw ontwikkelde ELISA was niet alleen gevoeliger dan deze kits, maar kon van meer graansoorten gliadinen detecteren. De commerciële kits kunnen geen prolaminen in gerst aantonen (Sorell et al., 1998). Momenteel zijn gevoeliger commerciële ELISA's verkrijgbaar om gluten te detecteren, met detectielimieten van 1,5-2 ppm.

Inmiddels zijn er voor routine-onderzoek van een gering aantal monsters ook dipstick sandwich immunoassay verkrijgbaar. Een voordeel is dat er geen speciale apparatuur (zoals een spectrofotometer) nodig is voor deze methode, en dat de uitslag in enkele minuten bekend is. Er zijn twee dipstick immunoassays met een gevoeligheid van 10 ppm verkrijgbaar om gluten te detecteren (Tabel 1). Een nadeel van de commerciële assays is dat ze niet in staat zijn om gluten in gerst te detecteren. Momenteel wordt er gewerkt aan commerciële ELISA's met een bredere specificiteit (Poms et al., 2004b).

Recent is er een sandwich ELISA beschreven die één enkel monokonaal antilichaam (R5) gebruikt als capture en detectie antilichaam. Dit antilichaam herkent een epitoom dat aanwezig is op prolaminen in tarwe, rogge en gerst, maar niet in haver. De detectielimiet was 1,6 ppm gliadine (3,2 ppm gluten) en inter-assay variatie was 8,7% en intra-assay variatie was 7,7% (Valdes et al., 2003).

3.2 SCHAALDIEREN

Karakteristieken allergie Ongeveer 1,7% van de patiënten met voedselallergie is allergisch voor garnalen en krab. Prevalentie voor garnalenallergie in astmatische kinderen met voedselallergie is 4,5%, terwijl in een andere studie 3,8% van de kinderen met voedselallergie op garnalen reageerden. Allergische reacties veroorzaken voornamelijk huidreacties, gevolgd door gastrointestinale problemen. Respiratoire symptomen worden nauwelijks waargenomen, maar ernstige en zelfs fatale anafylactische reacties zijn wel waargenomen. Tropomyosine is het enige allergeen dat geïdentificeerd is in garnalen. Daarnaast is in garnalen ook arginine kinase aangetoond als allergeen. Kruisreactiviteit tussen garnalen, kreeft, krab en langoustines wordt veroorzaakt door homologie van tropomyosine tussen de species. Tropomyosine vertoont ook homologie met het huisstofmijt allergeen Der p 10, en allergenen uit kakkerlakken, wormen en slangen waardoor kruisreactiviteit en kruissensibilisatie kan ontstaan (EFSA, 2004).

Detectiemethoden Er zijn weinig methoden beschreven om tropomyosine uit schaaldieren te detecteren. Een ELISA waarbij garnalen tropomyosine specifieke antilichamen werden gebruikt had een detectielimiet van 2,5 ppm. Er was significante kruisreactiviteit met andere schaaldieren, maar niet met tropomyosine van kip en varken (Poms et al., 2004b). Een soortgelijke sandwich ELISA met garnalen tropomyosine antilichamen vertoonde ook kruisreactiviteit met kreeft en krab. Er was geen kruisreactiviteit met kakkerlak, huisstofmijt, oester, kabeljauw en pinda. De methode was ook reproduceerbaar, inter- en intra-assay variatie waren 13 en 4,5%. De gevoeligheid van de ELISA was 4 ng/ml (Jeoung et al., 1997). Er is momenteel slechts één commerciële ELISA kit verkrijgbaar voor de detectie van schaaldieren, die tropomyosine detecteert met een gevoeligheid van 0,05 ppm tropomyosine (Tabel 1).

3.3 EIEREN

Karakteristieken allergie Allergie voor kippenei is één van de meest frequent voorkomende allergieën in kinderen, samen met melk en pinda allergie. Van de kinderen met een voedselallergie is ongeveer 35% allergisch voor eieren. Vaak groeien kinderen over de allergie heen. In volwassenen met voedselallergie, is ongeveer 12% allergisch voor ei. Symptomen die worden veroorzaakt zijn hetzelfde als bij andere voedselallergieën. De belangrijkste allergenen in ei eiwit zijn ovomucoid (Gal d 1), ovalbumine (Gal d 2), ovotransferrin (Gal d 3), en lysozyme (Gal d 4) en in eigeel levitine (Poms et al., 2004b).

Detectiemethoden Verschillende ELISA's zijn beschreven voor de detectie van allergenen in ei. Een erg gevoelige competitieve ELISA werd ontwikkeld met polyclonaal antiserum specifiek voor eiwitten uit het hele ei. Er was geen kruisreactiviteit tegen peulvruchten, noten, verschillende voedingsingrediënten, vlees, vis, brood, rijst, aardappel en noedels, maar wel tegen andere vogeleieren. Detectie van ei was mogelijk in verschillende producten, zoals ijs, noedels, pasta en brood met een gevoeligheid van 0,2 ppm (Yeung et al., 2000).

Een andere gevoelige sandwich ELISA werd ontwikkeld met capture antilichamen gericht tegen eiwit en detectie antilichamen tegen ovalbumine. De detectielimiet voor ei was 1 ppm. Verschillende pasta ingrediënten werden getest voor kruisreactiviteit en deze werd waargenomen voor gedroogde champignons en basilicum. Twintig verschillende pasta's werden getest en 55% bevatte ei in de range van 1 - >100.000 ppm (Hefle et al., 2001).

Voor snelle screening van producten is een dipstick immunoassay ontwikkeld met capture en detectie antilichamen gericht tegen eiwit. Deze methode kon alle voedingsmiddelen met ei

detecteren. Om de gevoeligheid van deze methode te bepalen werden koekjes en knoflooksaus met bekende hoeveelheden ei (van 0,002 - 20 ppm) geanalyseerd en tot 0,02 ppm kon gedetecteerd worden (Baumgartner et al., 2002).

Er zijn verschillende ELISA's commercieel verkrijgbaar met een detectielimiet die varieert van 0,3-5 ppm (Tabel 1).

3.4 VIS

Karakteristieken allergie De prevalentie van visallergie varieert van 5-10% van de patiënten met voedselallergie in Frankrijk, terwijl in Zweden 39% en in Spanje in twee verschillende studies 18 en 30% van de kinderen met voedselallergie allergisch werden bevonden voor vis. Net als schaaldieren veroorzaakt vis meestal huidreacties en gastrointestinale symptomen. Fatale anafylactische reacties zijn ook beschreven voor vis. Het belangrijkste allergeen in vis is parvalbumine, dat aanwezig is in spierweefsel. Van kabeljauw, karper, makreel en zalm is parvalbumine als allergeen geïdentificeerd. Aldehyde fosfaat dehydrogenase is als allergeen geïdentificeerd in heek, wijting, zalm, tonijn en schar. Vaak zijn patiënten allergisch voor meerdere vissoorten, omdat er kruisreactiviteit ontstaat door homologie van parvalbumine (EFSA, 2004).

Detectiemethoden Er zijn weinig methoden beschreven voor de detectie van visallergenen. Een competitieve radio-immunoassay (RIA) gebaseerd op patiëntensera was ontwikkeld voor de detectie van visallergenen in aerosolen op een vismarkt. Allergenen uit rauwe heek en scharretong werden gebruikt als capture en detectie antigenen. Met deze RIA konden visallergenen worden gedetecteerd in de lucht van de vismarkt. Er zijn geen verdere gegevens over de gevoeligheid van de methode en bruikbaarheid voor testen van voedingsmiddelen (Taylor et al., 2000). Omdat deze methode gebaseerd is op patiënten sera is hij niet geschikt voor routine analyse.

Recent is een PCR methode voor de detectie van allergenen in drie species van de Scomber makreel beschreven: de japanse, grote oceaan en atlantische makreel. Hiervoor werden Scomber specifieke primers gebruikt en met behulp van gel electroforese werden de PCR producten zichtbaar gemaakt. De PCR methode was specifiek voor deze drie makreel species en niet voor andere vissoorten. Er werden geen verdere gegevens over de gevoeligheid van de methode verstrekt (Aranishi en Okimoto, 2004). Tot op heden zijn er geen commerciële ELISA kits voor visallergenen.

3.5 PINDA

Karakteristieken allergie Ongeveer 0,5% van de algemene populatie is allergisch voor pinda en inname van pinda door deze gesensibiliseerde individuen kan heftige allergische reacties teweeg brengen. Anafylactische reacties veroorzaakt door voedsel worden in 10-47% veroorzaakt door pinda en meer dan de helft van de fatale voedselallergische reacties wordt toegeschreven aan pinda (Bock et al., 2001). Verschillende allergenen in pinda zijn geïdentificeerd en de belangrijkste zijn Ara h 1 en h 2.

Detectiemethoden Er zijn verschillende competitieve en sandwich methoden beschreven om pinda allergenen te detecteren. Er is een competitieve ELISA ontwikkeld met polyclonaal antiserum dat is opgewekt in dieren geïmmuniseerd met geroosterde pinda eiwitten. Dit antiserum herkent meerdere potentiële allergenen waaronder Ara h 1. Deze ELISA was specifiek voor pinda, want er werd geen kruisreactiviteit gemeten tegen peulvruchten, noten, en veelgebruikte ingrediënten zoals suiker, melk en cacao. De detectielimiet werd bepaald door verschillende producten, zoals chocolade, koekjes en ijs, met bekende hoeveelheden pinda te testen. De gevoeligheid was 0,4 ppm, ongeacht de voedselmatrix (Yeung en Collins, 1996).

Een vergelijkbare competitieve ELISA is ontwikkeld met commercieel verkrijgbaar pinda-specifiek polyclonaal antiserum. Kruisreactiviteit werd alleen gevonden voor walnoot en pintobonen, en niet voor andere peulvruchten, noten en granen. Deze kruisreactiviteit werd alleen aangetoond als er meer dan 20% van deze componenten in het voedsel aanwezig was. De intra- and interassay variatie was <10% voor monsters met >15 ppm pinda en <15% rond de detectielimiet. Deze was 2 ppm voor pinda eiwit en 10 ppm voor pinda. In totaal werden 30 commercieel verkrijgbare producten getest met deze ELISA. De meeste producten die volgens het label pinda bevatten werden met deze assay gedetecteerd, op twee producten na. In 5 van de 17 producten die volgens het label geen pinda bevatten, werd 2-18 ppm pinda eiwit aangetoond. Hieruit blijkt dat sommige producten niet goed gelabeld zijn (Holzhauser en Vieths, 1999).

Voor detectie van pinda zijn verschillende sandwich ELISA's beschreven in de literatuur. Er is een sandwich ELISA ontwikkeld met monoclonale antilichamen gericht tegen Ara h 1 met een detectielimiet van 30 ng per ml. De intra- en interassay variatie waren 3% en 12%, respectievelijk en er was geen kruisreactiviteit voor andere noten of peulvruchten. Deze Ara h 1 ELISA was vergeleken met een commerciële ELISA voor pinda eiwit door gebruik te maken van 83 verschillende commercieel verkrijgbare producten met en zonder pinda. Beide ELISA's konden de producten met pinda identificeren, op twee producten na die alleen werden gedetecteerd met de commerciële ELISA. Deze twee producten bevatten chocolade,

die waarschijnlijk interfereerde met Ara h 1 binding. Matrixeffecten kunnen dus een belangrijke rol spelen bij de specificiteit van een ELISA (Pomes et al., 2003).

Voor pinda is een dipstick immunoassay ontwikkeld voor de 7S globuline uit pinda. Met deze methode was het mogelijk om tot 100 ppm pinda te detecteren in marsepein en 1000 ppm in chocolade. De voedselmatrix bepaalt dus de gevoeligheid van deze assay. Deze dipstick assay is minder gevoelig dan de genoemde ELISA's, maar kan wellicht wel gebruikt worden voor een snelle screening (Mills et al., 1997).

In 2002 werd een gevoeliger dipstick methode beschreven waarbij gebruikt wordt gemaakt van een commercieel verkrijgbaar polyclonaal serum gericht tegen pinda extract. De methode vertoonde 20% kruisreactiviteit tegen pinto bonen, witte bonen, walnoot en koffiebonen. Deze methode werd vergeleken met een sandwich ELISA en een competitieve ELISA door verschillende commercieel verkrijgbare producten met en zonder pinda te testen. De drie methoden konden alle producten met pinda identificeren. De dipstick sandwich ELISA was positief voor monsters die volgens de ELISA's 2,6 ppm pinda bevatten en lijkt een geschikte methode voor snelle screening van producten, maar kan alleen gebruikt worden voor kwalitatieve analyses (Stephan et al., 2002).

Recent werd er een snelle sandwich ELISA beschreven voor detectie van pinda in complexe voedselmatrices. Monoclonale en polyclonale antilichamen waren gericht tegen geroosterde pinda. Het monoclonale antilichaam werd gebruikt als capture en het polyclonale antilichaam als detectie antilichaam. De ELISA kon in 30 minuten worden uitgevoerd. Geringe kruisreactiviteit (ppm en ppt range) werd gevonden voor verschillende noten en peulvruchten. Intra- en interassay variatie was <15%. Verschillende matrices met bekende hoeveelheden pinda werden getest om de detectielimiet van de ELISA te bepalen. Deze was 0,2 ppm voor koekjes en pure chocolade, 0,4 ppm voor ontbijtgranen en vanille ijs en 0,8 ppm voor melkchocolade. Verschillende voedingsmiddelen werden met deze ELISA geanalyseerd. Producten met pinda op het etiket werden gedetecteerd met de ELISA. Sommige producten die mogelijk pinda bevatten, waren ook positief en bevatten pinda in de lage ppm range (Kiening et al., 2005).

Er zijn nog maar weinig PCR methoden beschreven die pinda DNA kunnen detecteren. Voor de detectie van Ara h 2 gen is een real-time PCR opgezet. Deze methode was specifiek voor pinda en vertoonde geen kruisreactiviteit met andere noten, peulvruchten, vlees, vis, zaden en chocolade. Koekjes waarin 2 ppm pinda aanwezig werden positief bevonden met deze PCR methode (Hird et al., 2003).

Om meer inzicht te verkrijgen in bruikbaarheid en gevoeligheid van verschillende methoden om pinda allergenen te detecteren is een sandwich ELISA vergeleken met real-time PCR. In de sandwich ELISA werd gebruik gemaakt van commercieel polyclonaal antiserum gericht tegen pinda extract en in de PCR werd gebruik gemaakt van primers en probes specifiek voor

Ara h 2 gen. Beide methoden vertoonden geen kruisreactiviteit met noten, peulvruchten en granen. De detectielimiet voor de ELISA was $0,07 \pm 0,04$ ppm pinda eiwit en voor de PCR 10 kopieën per reactie. Monsters die 10 ppm pinda bevatten konden nog worden gedetecteerd met de PCR methode. In totaal werden 33 commerciële producten getest en werden producten die pinda bevatten met beide methoden gedetecteerd. Twee producten die gelabeld waren met “kan sporen van noten bevatten”, waren positief in zowel ELISA als PCR en twee producten die niet gelabeld waren positief in zowel ELISA als PCR en bevatten 6,3 en 74 ppm. Eén niet-gelabeld product was positief in de PCR en niet in de ELISA (Stephan en Vieths, 2004).

Voor pinda zijn verschillende commerciële ELISA en PCR kits verkrijgbaar (Tabel 1 en 2). Grote verschillen tussen de kits zijn target (Ara h 1, Ara h 2, geselecteerde eiwitten, ruw pinda extract), de extractie procedure, de detectielimiet (van 0,1 – 2,5 mg/kg), benodigde tijd voor analyse en de kosten. Er zijn studies uitgevoerd om een aantal van deze kits met elkaar te vergelijken. De bruikbaarheid van vier verschillende kits (Veratox® Peanut van Neogen, Prolisa™ van Canadian food testing laboratories, ELISA-TEK™ van Elisa-technologies en Ridascreen® van R-Biopharm) was uitgetest door gebruik te maken van chocolade waarin een bekende hoeveelheid pinda zat (0, 10, 40 en 200 ppm). Extractie van pinda uit chocolade kan problemen opleveren en daarom was voor deze matrix gekozen. Er was een groot verschil in de nauwkeurigheid van de assays. Volgens de ene kit bevatten alle monsters een hoeveelheid van >25 ppm. Een dosis respons werd vastgesteld door 2 andere kits van 5, 12 en >90 ppm en 10, 100 en 60 ppm, respectievelijk. De laatste kit kon concentraties <40 ppm niet detecteren, en gaf een waarde van 50 ppm voor de hoogste concentratie. Variatie in kits kan ontstaan door verschil in extractie efficiëntie van pinda uit de chocolade en door de gebruikte pinda standaard. De kits lijken geschikt voor kwalitatieve screening van producten, maar voor kwantitatieve screening zijn ze niet betrouwbaar genoeg (Hurst et al., 2002).

In een soortgelijke studie werden Veratox® Peanut van Neogen, Ridascreen® van R-Biopharm, ELISA-TEK™ van ELISA Technologies en Prolisa™ van Pro-Lab Diagnostics met elkaar vergeleken waarbij gebruik werd gemaakt van bekende hoeveelheden opgezuiverde Ara h 1 en Ara h 2 eiwitten. Alle kits detecteerden Ara h 1 en h 2 in onbehandelde pinda. ELISA-Tek en Prolisa waren het gevoeligst voor Ara h 1, gevolgd door Ridascreen en Veratox. Prolisa was het gevoeligst voor Ara h 2, gevolgd door ELISA tek, Veratox en Ridascreen. De gedetecteerde concentraties konden niet worden vergeleken omdat per kit verschillende units werden gebruikt, te weten ppm pinda of ppm pinda eiwit. De gevoeligheid van de kits voor detectie van Ara h 1 en h 2 in geroosterde pinda's was lager dan de gevoeligheid voor onbehandelde pinda's. Dit komt waarschijnlijk door verandering van eiwitten door verhitting, waardoor epitopen niet meer herkend worden door antilichamen (Nogueira et al., 2004).

Recent is er een interlaboratorium validatie studie uitgevoerd door het Directorate Joint Research Centre van de Europese Commissie, waarin vijf commerciële ELISA kits zijn vergeleken. De volgende kits zijn gevalideerd:

- A. de Biokits Peanut Assay van Tepnel die Ara h 1 meet
- B. de Peanut Residue ELISA kit van Elisa systems, die Ara h 2 meet
- C. de Prolisa Peanut PAK ELISA van Pro-Lab Diagnostics, die totaal oplosbaar pinda eiwit meet
- D. de Ridascreen Peanut van P-Biopharm, die totaal oplosbaar pinda eiwit meet
- E. de Veratox van Neogen, die totaal oplosbaar pinda eiwit mee

Elke ELISA kit werd in 12-14 laboratoria getest, waarbij gebruik werd gemaakt van biscuits met 0, 2, 5 en 10 ppm en donkere chocolade met 0, 2,5, 5 en 10 ppm pinda. Over het algemeen konden alle vijf kits pinda goed detecteren in de range van 5-10 ppm, terwijl in de 2-2,5 ppm range hoeveelheden pinda niet helemaal nauwkeurig konden worden gemeten. ELISA kit A en B konden pinda in biscuit goed aantonen, kit E en C overschatten de hoeveelheid en kit D onderschatte de hoeveelheid pinda. Detectie van pinda in chocola werd vooral door kit A goed uitgevoerd, kit E overschatte de hoeveelheid en kit B, C en D onderschatten de hoeveelheid pinda. Vals-negatieve resultaten werden vooral in de lage ppm range gevonden voor drie van de vijf methoden (Poms et al., 2005).

Pinda allergenen konden ook worden aangetoond met een andere immunoassay, rocket immunoelectroforesis (RIE). In deze methode werd gebruik gemaakt van een gel die commercieel polyclonaal antiserum gericht tegen het eiwit extract van pinda bevatte. Met behulp van electroforese werd vervolgens bepaald of de te analyseren monsters pinda eiwitten bevatten. Deze methode had een detectielimiet van 0.55 ppm voor pinda eiwit en 2 ppm voor pinda in chocolade. De methode werd vergeleken met een methode waarbij een basofiel-cel lijn werd gebruikt. De basofielen werden gesensibiliseerd met muizen IgE specifiek gericht tegen pinda. Als de te analyseren monsters pinda bevatten, zal dit IgE op de basofiel cross-linken en degranulatie veroorzaken. Degranulatie kan worden gemeten door α -hexosaminidase gemeten, één van de mediators die ook tijdens een allergische reactie vrijkomt. De detectielimiet was 100 ppm en deze methode is dus duidelijk minder gevoelig dan de hierboven beschreven assays (Holzhauser et al., 1998).

Naast de hierboven besproken immunoassays en PCR methoden kunnen pinda allergenen ook worden aangetoond met analytische methoden, waarbij na enzymatische digestie van het eiwit in peptiden vloeistof chromatografie werd gecombineerd met massa spectrometrie (LC/MS/MS) om Ara h 1 aan te tonen. Met deze methode kon Ara h 1 aangetoond worden tot een concentratie van 10 ppm (Shefcheck en Musser, 2004).

3.6 MELK EN ZUIVELPRODUCTEN

Karakteristieken allergie Melk is een belangrijk voedselallergeen, met name gedurende de kleutertijd. Naast allergenen bevat melk ook lactose, een suiker (disacharide), die in gevoelige personen lactose intolerantie kan veroorzaken. Lactose wordt in de darmen door lactase omgezet in kleinere suikers, die vervolgens opgenomen kunnen worden. Individuen met lactase deficiëntie kunnen lactose minder goed omzetten en opnemen. Ophoping van lactose in de darmen veroorzaakt symptomen zoals buikpijn, opgeblazen gevoel, winderigheid, en in ernstige gevallen acute diarree. De meeste patiënten kunnen ongeveer 7 tot 10 gram lactose (ongeveer 200 ml melk) zonder problemen innemen. Problemen gaan zich voordoen als grote hoeveelheden lactose in één keer worden ingenomen en de lactase capaciteit tekort schiet. Ook kunnen sporen van koemelk eiwitten in lactose problemen opleveren voor patiënten met koemelk allergie (EFSA, 2004). Lactose kan worden gedetecteerd met analytische technieken zoals gas en vloeistof chromatografie (Casterline et al., 1999; Chavez-Servin et al., 2004).

Verschillende eiwitten in melk veroorzaken allergische reacties die vooral bij baby's en jonge kinderen voorkomen. De prevalentie is ongeveer 1% in de algemene populatie en 2-3% in kinderen. Eiwitten uit melk van koeien, maar ook van geiten en schapen kunnen allergische reacties veroorzaken die variëren van mild tot ernstig en zich kunnen manifesteren in de huid, longen, darmen of systemisch (anafylactische shock). Bij kinderen verdwijnt deze allergie meestal binnen de eerste 6 jaar na geboorte. Patiënten kunnen door meerdere eiwitten gesensibiliseerd worden. In een groot onderzoek is aangetoond dat de meeste patiënten gesensibiliseerd zijn door β -lactoglobuline (Bos d 5), caseïnes (Bos d 8), α -lactalbumin (Bos d 4), serum albumine (Bos d 6), lactoferrine en immunoglobulines (Bos d 7). Kruisreactiviteit is beschreven voor melk van geiten en schapen. In sojabonen is ook een eiwit aanwezig dat kan kruisreageren met koemelk caseïne. Dit kan problemen opleveren voor baby's met een koemelkallergie die overstappen op babyvoeding op basis van soja (EFSA, 2004).

Detectiemethoden Er zijn verschillende methoden beschreven om melkeiwitten te detecteren in voedsel. Twee verschillende sandwich ELISA's zijn ontwikkeld om niet-gedenatureerd en gedenatureerd koemelk β -lactoglobuline te detecteren met behulp van antisera gericht tegen deze eiwitten. De gevoeligheid van deze assays was 30 pg/ml voor niet-gedenatureerd en 200 pg/ml voor gedenatureerd β -lactoglobuline (Negroni et al., 1998).

Een soortgelijke sandwich ELISA is met een gevoeligheid van 2 pg/ml. De methode is erg gevoelig en kon β -lactoglobuline detecteren in moedermelk nadat moeders melk hadden gedronken en in hypoallergene babyvoeding met 0,84 μ g/l β -lactoglobuline (Makinen-Kiljunen en Palosuo, 1992).

Detectie van sporen van koemelk in hypoallergene babyvoeding is essentieel om ernstige allergische reacties te voorkomen in gevoelige patiënten. Met behulp van monoclonale en polyclonale antilichamen gericht tegen caseïne componenten is uitgezocht welke competitieve ELISA het meest geschikt is om sporen van caseïne aan te tonen in hypoallergene babyvoeding. Tien verschillende producten werden getest, onder andere niet-, deels en intensief gehydrolyseerde melkpoeders. De ELISA met polyclonale antilichamen leek het meest geschikt, waarschijnlijk omdat deze meerdere antigene determinanten kan detecteren. De methode kon tot 50 mg caseïne per 100 g totaal eiwit detecteren. Met deze gevoeligheid werd ook caseïne gedetecteerd in intensief gehydrolyseerde melkpoeder. Overstappen naar hypoallergene voeding kan hierdoor toch nog allergische reacties veroorzaken in gevoelige patiënten (Plebani et al., 1997).

Er zijn ook een aantal commerciële ELISA kits verkrijgbaar voor detectie van koemelk allergenen, zoals serum albumine, caseïne en β -lactoglobuline. De gevoeligheid van deze ELISA's ligt tussen de 1 en 5 ppm (Tabel 1).

Voor de detectie van melkeiwitten in sojamelk is een Western blot methode beschreven. SDS-PAGE werd toegepast om soja- en melkeiwitten te scheiden, gevolgd door immunodetectie van β -lactoglobuline en α -lactalbumine. Met deze Western blot methode werden zowel β -lactoglobuline als α -lactalbumin gedetecteerd in sojamelk. De gevoeligheid was 100 mg per 100 g totaal eiwit (Molina et al., 1998). Om melkeiwitten in sojamelk te detecteren is ook een HPLC methode ontwikkeld, waarin soja- en melkeiwitten gescheiden worden. De gevoeligheid van deze methode was 1 gram per 100 gram eiwit voor α -lactalbumin en 1,3 gram per 100 gram eiwit voor β -lactoglobuline (Garcia et al., 1998).

3.7 SOJA

Karakteristieken allergie Soja is een veel gebruikt eiwit in voeding onder andere als texturiser en emulsifier. Soja is dan ook een veel voorkomend “verborgen” allergeen. Een schatting is dat inname door volwassenen in Europa ongeveer 1-2 gram per dag is. Daarnaast is er ook flesvoeding op basis van soja verkrijgbaar als alternatief voor baby's met koemelkallergie. De prevalentie van soja allergie wordt geschat op 0,3-0,4% in de algemene populatie en 6% in atopische kinderen. De allergie verdwijnt vaak als de kinderen ouder worden. Klinische symptomen variëren van enterocolitis tot atopisch eczeem, en ook fatale reacties zijn gerapporteerd. Er zijn verschillende allergenen geïdentificeerd, Gly m 1, Gly m 2, Gly m 3, Gly m 4 en Gly m Bd 30K (EFSA 2004).

Detectiemethoden Er zijn een aantal ELISA's beschreven die soja detecteren in voedsel waarbij monoclonale antilichamen zijn gebruikt gericht tegen verschillende eiwitten in soja, zoals glycinin, β -conglycinin, trypsine remmers of het hele soja eiwit. Deze methoden waren ontwikkeld om vervuiling van vlees met soja te detecteren en hoefden niet erg gevoelig te zijn. Om kleine hoeveelheden soja te detecteren zijn nieuwe en gevoeliger assays ontwikkeld. De beste resultaten werden verkregen met een competitieve ELISA waarbij polyclonale antilichamen tegen het hele soja eiwit werden opgewekt. De detectielimiet van deze ELISA was 0.4 ppm en er was minimale kruisreactiviteit tegen tarwe (Koppelman et al., 2004).

Er is één gevoelige sandwich ELISA commercieel verkrijgbaar. Deze ELISA detecteert soja trypsine remmers met een gevoeligheid van <1ppm (tabel 1). Daarnaast zijn er nog commerciële PCR kits verkrijgbaar, een kwalitatieve PCR-ELISA en een semikwantitatieve reelt time PCR kit (Tabel 2). De gevoeligheid van deze methodes ligt beneden 10 ppm (Poms et al., 2004b).

3.8 NOTEN

Inname van noten is veelvuldig de oorzaak van ernstige allergische reacties, die zelfs fataal kunnen zijn. Van de 37 door voedsel geïnduceerde fatale allergische reacties in Engeland werden er 5 veroorzaakt door walnoten en 10 door niet nader gespecificeerde noten. In de Verenigde Staten werden 32 fatale allergische reacties gerapporteerd, waarvan er 3 veroorzaakt werden door walnoten, 2 door paranoten, 2 door pecannoten, 1 door pistachenoten en 2 door niet nader gespecificeerde noten. Gegevens uit een register van patiënten met allergie voor noten laten zien dat walnoot het meest frequent allergische reacties veroorzaakt (34%), gevolgd door cashew (20%), amandel (15%), pecan (9%) en pistache (7%). Andere noten zoals hazelnoot en paranoot veroorzaakten minder dan 5% van de reacties (EFSA, 2004). Correcte etikettering van producten die noten bevatten is dus erg belangrijk en hiervoor zijn goed gevalideerde en gestandaardiseerde methoden nodig. Echter, er zijn tot op heden weinig methoden beschreven om noten te detecteren, behalve voor hazelnoot.

HAZELNOOT

Karakteristieken allergie De prevalentie van hazelnootallergie is 0,1-0,5% in Europa en hazelnootallergie wordt vaak geassocieerd met allergie tegen pollen van bomen zoals berk, eik, en els. Ongeveer 50-70% van de patiënten met pollenallergie is gesensibiliseerd voor hazelnoot en ongeveer de helft hiervan ontwikkelt hierdoor klinische symptomen, die zich

meestal uiten in het orale allergie syndroom, maar hazelnoot kan ook urticaria, astma, diarree of anafylactische shock veroorzaken (Koppelman et al., 1999). Het belangrijkste allergeen in hazelnoot is Cor a 1, wat kruisreactiviteit vertoont met Bet v 1 uit berkenpollen. Hazelnoot is een veelvuldig gebruikt ingrediënt, bijvoorbeeld in ijs, noga, mueslirepen en chocoladeproducten (Poms et al., 2004b).

Detectiemethoden Verschillende ELISA's voor hazelnoot zijn beschreven in de literatuur. Een sandwich ELISA was ontwikkeld met antiserum van konijnen die waren geïmmuniseerd met hazelnoot eiwit. Kruisreactiviteit werd waargenomen voor walnoot, cashewnoot, paranoot en amandel. De detectielimiet was 1 ppm en met deze gevoeligheid werden verschillende producten met en zonder hazelnoot geanalyseerd. De ELISA was in staat om de verschillende producten goed te classificeren. Opmerkelijk was dat een product dat volgens de fabrikant een spoor hazelnoot kon bevatten, de hoogste concentratie hazelnoot bevatte. Hieruit blijkt dat labeling door producenten dus niet altijd de juiste informatie geeft (Koppelman et al., 1999).

Een sandwich ELISA werd ontwikkeld door gebruik te maken van polyclonale antilichamen opgewekt in kippen tegen hazelnoot extract. De ELISA was specifiek voor hazelnoot en had een detectielimiet van 0,25-1 ppm afhankelijk van het geteste voedsel (Blais en Phillippe, 2001).

Polyclonaal antiserum gericht tegen hazelnoot werd ook toegepast in een competitieve ELISA. Er werd geen kruisreactiviteit waargenomen voor verschillende peulvruchten, noten en voedingsingrediënten. De assay kon hazelnoot detecteren tot 0,45 ppm en was hierdoor in staat om een reeks van producten met hazelnoot te detecteren (Ben Rejeb et al., 2003).

Een andere sandwich ELISA maakte gebruik van polyclonaal konijn IgG gericht tegen pepsine-gedigesteerde hazelnoot als capture en tegen niet-gedigesteerd hazelnoot als detectie antilichamen. Hierdoor is deze ELISA in staat om stabiele eiwitten te meten die bestand zijn tegen digestie. Eiwitten in voedsel die in staat zijn om voedselallergie te veroorzaken zijn vaak bestand tegen pepsine afbraak. De ELISA vertoonde geringe kruisreactiviteit met pinda (0,034%), walnoot (0,017%), amandel (0,008%) en sesamzaad (0,002%). De detectielimiet was <1 ppm. Verschillende producten met en zonder hazelnoot werden getest in deze ELISA en de concentratie vermeld op het product werd vergeleken met de gemeten concentratie en de ratio concentratie product/concentratie gemeten varieerde van 0,4 tot 2,2 (Akkerdaas et al., 2004).

Er is ook een dipstick sandwich ELISA beschreven voor hazelnoot. De strips werden gelabeld met polyclonaal antiserum gericht tegen de coryline fractie van rauwe hazelnoot of met polyclonaal antiserum gericht tegen een mix van coryline van gewone en geroosterde hazelnoot. De methode vertoonde helaas 25% kruisreactiviteit voor kidney bonen,

pijnboompitten, kokosnoot vlokken en 0,4% voor walnoot. De correlatie tussen de dipstick sandwich ELISA en een gewone sandwich ELISA voor hazelnoot was goed, alle 38 producten werden hetzelfde beoordeeld, zelfs producten met minder dan 1 ppm hazelnoot (Stephan et al., 2002).

Recent werd er een snelle sandwich ELISA beschreven voor detectie van hazelnoot in complexe voedsel matrices. Monoclonale en polyclonale antilichamen waren gericht tegen geroosterde hazelnoot. Het monoclonale antilichaam werd gebruikt als capture en het polyclonale antilichaam als detectie antilichaam. De ELISA kon in 30 minuten worden uitgevoerd. Geringe kruisreactiviteit (ppm) werd gevonden voor walnoot. Intra- en interassay variatie was 10% en <11% respectievelijk. Verschillende matrices met bekende hoeveelheden hazelnoot werden getest om de detectielimiet van de ELISA te bepalen. Deze was 0,4 ppm voor koekjes, 0,6 ppm voor ontbijtgranen, 0,2 ppm voor vanille ijs en pure chocolade en 1,2 ppm voor melkchocolade. Verschillende voedingsmiddelen werden met deze ELISA geanalyseerd. Producten met hazelnoot op het etiket werden gedetecteerd met de ELISA. Sommige producten die mogelijk pinda bevatten, waren ook positief en er was zelfs 1 product dat 5800 ppm hazelnoot bevatte (Kiening et al., 2005).

Momenteel zijn er twee ELISA's en één PCR methode commercieel verkrijgbaar voor de detectie van hazelnoot (Tabel 1 en 2). De commerciële PCR-ELISA is vergeleken met een sandwich ELISA. In de ELISA werd polyclonaal antiserum gericht tegen hazelnoot gebruikt en in de PCR-ELISA werd cDNA van Cor a 1,0401 gebruikt als probe. De sandwich ELISA vertoonde kruisreactiviteit met walnoot, pompoenzaad en cashewnoten als hiervan 20, 10 en 50% aanwezig was. De PCR-ELISA vertoonde geen kruisreactiviteit met peulvruchten, noten, granen en andere relevante ingrediënten. Beide methoden waren erg gevoelig, de sandwich ELISA kon 0,4 ppm hazelnoot eiwit of 4 ppm hazelnoot detecteren en de PCR-ELISA <10 kopieën. Met beide methoden werden 41 commerciële producten getest. De PCR-ELISA kon in alle vijftien producten die hazelnoot bevatten het detecteren, terwijl met de sandwich ELISA twee producten niet gedetecteerd werden. Dit waren toetjes die hazelnoot bevatten en wellicht is het hazelnoot eiwit gedegradeerd door de pH van het product of aanwezigheid van microbiële enzymatische activiteit. Van de veertien producten die volgens het etiket misschien hazelnoot konden bevatten waren zeven producten positief in zowel ELISA als PCR. Voor detectie van lage hoeveelheden hazelnoot in producten (<1 ppm) lijkt de PCR methode geschikter omdat deze gevoelig is. Drie van de vier producten werd gedetecteerd met PCR en maar één met ELISA (Holzhauser et al., 2002).

AMANDEL

Het belangrijkste allergeen in amandel is amandine. Voor de detectie van amandel zijn verschillende methoden beschreven. Een SDS-PAGE/immunoblot methode kon 5 ppm amandel detecteren in chocolade. Een sandwich ELISA die gebruik maakt van polyclonaal antiserum gericht tegen geroosterde amandel had een gevoeligheid van 1 ppm. Deze methode vertoonde significante kruisreactiviteit (>30% maximum absorptie) met walnoot, paranoot, cashewnoot, hazelnoot, macadamianoot, pistachenoot en sesamzaad (Hlywka et al., 2000). Een specifiekere competitieve ELISA werd ontwikkeld met antisera gericht tegen amandine. Deze ELISA vertoonde weinig kruisreactiviteit en had een gevoeligheid van 5 ppm in verschillende producten met amandel (Roux et al., 2001). Momenteel zijn twee ELISA's commercieel verkrijgbaar voor detectie van amandel met een detectielimiet van 2.5 en 5 ppm (Tabel 1). Daarnaast zijn er drie PCR methoden op de markt die amandel kunnen detecteren (Tabel 2).

ANDERE NOTEN

Er zijn slechts weinig methoden beschreven voor de detectie van andere noten in voeding. Cashewnoten bevatten anacardeïne, een oplosbaar globuline, dat allergische reacties kan veroorzaken. Er is maar één sandwich ELISA beschreven om anacardeïne te detecteren. Er werd een geringe kruisreactiviteit waargenomen voor pistachenoten, walnoot en pecannoten. De ELISA kon 1 ppm anacardeïne in voeding detecteren (Wei et al., 2003).

Belangrijke allergenen in walnoot zijn 2S albumine Jug r 1 en viciline Jug r 2. Er is één sandwich ELISA beschreven met een gevoeligheid van 1 ppm. Deze ELISA vertoonde enige kruisreactiviteit met hazelnoot, pecan en sesamzaad (Poms et al., 2004b).

Er zijn methodes ontwikkeld die meerdere noten kunnen detecteren, bijvoorbeeld een multiplex methode voor detectie van pinda, hazelnoot, amandel, cashewnoot en paranoot in chocolade. Deze semi-kwantitatieve immunoassay kon 2 ppm eiwit van ieder ingrediënt detecteren (Poms et al. 2004b). Een soortgelijke methode is beschreven voor detectie van pinda, hazelnoot en paranoot, waarbij gebruik werd gemaakt van een omgekeerde dot blot methode waarbij antilichamen uit eidooiers werden gekoppeld aan een membraan. De detectielimiet varieerde tussen de 0,1-1 ppm voor hazelnoot, 0,1-0,5 ppm voor paranoot en 0,1 ppm voor pinda.

3.9 SESAMZAAD

Karakteristieken allergie Sesamzaad is een potent voedselallergeen en door toename in gebruik van sesamzaad en sesamolie in voeding neemt het aantal en de ernst van de

voedselallergische reacties tegen sesamzaad toe. In Europa varieert de prevalentie onder mensen met voedselallergie tussen 0,7 en 1,2%. Allergische reacties kunnen zeer heftig zijn, met een hoog risico op fatale anafylactische reacties. Sesam bevat verscheidene allergenen die recent zijn geïdentificeerd: Ses i 1, Ses i 2 en Ses i 3, allemaal 2 S albumines. Ses i 1 vertoont 40% homologie met 2 S albumines uit zonnebloemzaad, paranoot en ricinuszaad (EFSA, 2004).

Detectiemethoden Er is één immunoassay voor detectie van sesam eiwitten beschreven, maar informatie over validatie ontbrak (Brett et al., 1998). Er zijn een paar commerciële ELISA kits verkrijgbaar (Tabel 1), die oplosbaar sesam eiwit of 2S albumine detecteren met een gevoeligheid van <0,1 en <1 ppm, respectievelijk.

3.10 SELDERIE

Karakteristieken allergie Selderie veroorzaakt voedselallergie die vaak gerelateerd is aan berkenpollenallergie, vooral in Europese landen. In Zwitserland is ongeveer 40% van de patiënten met voedselallergie gesensibiliseerd voor selderie en in Frankrijk 30%. Inname van selderie kan leiden tot zeer ernstige en zelfs fatale reacties. De meeste patiënten hebben alleen reacties tegen rauwe en niet tegen gekookte selderie. Er zijn verschillende allergenen geïdentificeerd: Api g 1, g 4 en g 5 en deze vertonen homologie met allergenen uit pollen (EFSA, 2004).

Detectiemethoden Er is momenteel één commerciële PCR methode verkrijgbaar om selderie te detecteren (Tabel 2). De gevoeligheid van deze methode is <5 kopieën.

3.11 MOSTERD

Karakteristieken allergie Mosterd wordt gemaakt van zaad van een of meer soorten mosterdplanten. In Europa wordt mosterd veelvuldig geconsumeerd en kan het aanwezig zijn in producten zoals mayonaise. Van de patiënten met voedselallergie heeft 1-7% mosterd allergie, afhankelijk van de regio waar het onderzoek plaatsvond. Klinische symptomen variëren van orale allergie, astma, urticaria, atopisch eczeem tot anafylactische reacties. Mosterd bevat verschillende irriterende stoffen, die in staat zijn om niet-immunologische reacties te veroorzaken die sterk lijken op allergische reacties. Belangrijke allergenen zijn Sin a 1 in gele mosterd en Bra j 1 in oriëntale mosterd (EFSA, 2004).

Detectiemethoden Momenteel is er één PCR methode commercieel verkrijgbaar die *Brassica sinapus alba* DNA kan detecteren met een detectielimiet kleiner dan 5 kopieën (Tabel 2).

3.12 SULFIET

Karakteristieken Sulfit kan in voeding voorkomen als gevolg van gisting of door toevoeging als conserveringsmiddel. In gevoelige personen veroorzaakt sulfit astmatische reacties. Dit zijn geen allergische reacties want de reacties zijn niet immunologisch gemedieerd. De prevalentie is onbekend, maar de FDA schat dat 1% van de algemene bevolking en 5% van patiënten met astma gevoelig is voor sulfit. Verschijnselen die optreden na inname van sulfit zijn meestal ernstige bronchospasmen, daarnaast zijn bradycardie, koorts, gastrointestinale problemen, urticaria, angio-oedeem, hypotensie en shock ook geobserveerd. De exacte pathogenese van deze verschijnselen is niet bekend en symptomen worden zeldzaam gemedieerd door IgE (EFSA, 2004). Volgens de EU Food Labelling Directive 2000/13/EC mag er niet meer dan 10 ppm sulfit in voedsel aanwezig zijn (European Commission, 2000).

Detectiemethoden Sulfit wordt met behulp van chemisch-analytische methoden gedetecteerd. Bijna alle methoden zijn variaties op twee methoden: de Ripper methode (1892) en de Monier-Williams methode (1927). De Ripper methode detecteert vrij SO₂ en maakt gebruik van toevoeging van jodium. De hoeveelheid SO₂ wordt bepaald aan de hand van de hoeveelheid toegevoegd jodium. De Monier-Williams methode maakt ook gebruik van jodium maar meet totaal SO₂ door middel van destillatie gevolgd door titratie met een standaard alkalische oplossing. In beide methoden kunnen andere ingrediënten interfereren met de assay, waarbij de kans bestaat op vals-positieven (EFSA, 2004). De Association of Official Analytical Chemists International Research Institute heeft de geoptimaliseerde Monier-Williams methode gevalideerd in een interlaboratorium studie. Deze methode was gevoelig genoeg om 10 ppm sulfit te detecteren in drie verschillende voedselproducten (Hillery et al., 1989). Er is één commerciële kit verkrijgbaar waarmee sulfit op garnalen kan worden gedetecteerd (www.neogen.com).

4 EXPERTISE IN NEDERLAND

Twee belangrijke instituten die in Nederland expertise hebben op het gebied van detectiemethodieken voor voedselallergenen zijn TNO Kwaliteit van Leven in Zeist en RIKILT, Instituut voor Voedselveiligheid in Wageningen.

TNO Kwaliteit van Leven heeft een aantal ELISA's zelf ontwikkeld voor de detectie van pinda, hazelnoot (Koppelman et al., 1999), soja (Koppelman et al., 2004) en mosterd. Voor de detectie van vis en verschillende noten heeft TNO recent ook PCR methoden ontwikkeld. Daarnaast wordt voor detectie van deze en andere voedselallergenen gebruik gemaakt van commercieel verkrijgbare kits (ELISA en PCR) om voedselallergenen te detecteren. De intentie is om voor alle voedselallergenen die zijn vermeld op de EU lijst (Directive 2003/89/EG bijlage IIIa) detectiemethodieken voorhanden te hebben (contactpersoon TNO: Dr. Gert van Duijn).

Op het RIKILT zijn verschillende methoden ontwikkeld voor detectie van voedselallergenen. Dit instituut ontwikkelt monoklonale en polyklonale antilichamen die vervolgens worden toegepast in verschillende typen immunoassays (ELISA, dipstick, biosensoren en Luminex multiplex). Zij hebben onder andere antilichamen ontwikkeld tegen eiwitten uit hazelnoot, walnoot, pinda, soja, melk, lupine, ei, erwt, sesam en tarwe.

RIKILT was partner in het EU project AllergenTest waarin monoklonale antilichamen, snelle ELISA's en dipsticks ontwikkeld zijn voor detectie van hazelnoot en pinda (Kiening et al., 2005). De ontwikkelde testen zijn in een Europese interlaboratorium studie onderzocht met consumenten producten uit verschillende landen. De ontwikkelde testen zullen binnenkort door een project partner op de markt gebracht worden.

Voor pinda en hazelnoot wordt momenteel een LUMINEX methode opgezet. Daarnaast worden deze antilichamen ook toegepast in biosensoren zoals BIACORE, SPREETA, en binnenkort IBIS Imaging. Dit onderzoek is in het bijzonder gericht op snelle multi-analyte detectie methoden voor gebruik in voeding.

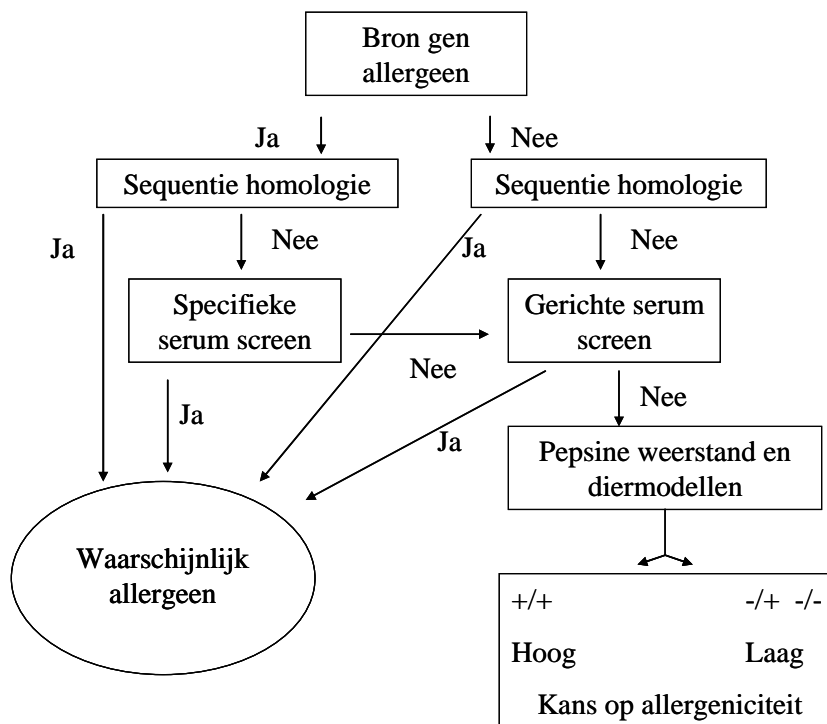
Monique Bremer van het RIKILT zit samen met Jacqueline van der Wielen van de VWA in de werkgroep CEN/TC 275/WG 12 "Food Allergens" van de European Committee of Standardization (CEN), en is lid van de stuurgroep van het Allergie Consortium Wageningen (ACW). De CEN werkgroep is gericht op het inventariseren van beschikbare detectiemethoden, en vervolgens het valideren en standaardiseren van de beschikbare methoden. Verder houdt de werkgroep zich ook bezig met meer algemene onderwerpen met betrekking tot detectie van voedselallergenen zoals extractiemethoden, benodigde referentie materialen, sampling methodes, en drempelwaardes.

5 BEOORDELING VAN “NOVEL FOODS” OP MOGELIJKE ALLERGENICITEIT

Novel foods zijn producten die nooit eerder zijn gebruikt als voedsel, het resultaat zijn van een proces dat nooit eerder is gebruikt voor voedselbereiding of afkomstig zijn van genetisch gemodificeerde organismen. Tegenwoordig zijn er een groot aantal planten genetisch gemodificeerd, onder andere voor betere bescherming tegen insecten, verbeterde weerstand tegen virussen en tolerantie voor herbiciden. In de meeste gevallen is deze verandering tot stand gebracht door introductie van één of meerdere genen die coderen voor nieuwe eiwitten. De zorg bestaat dat deze nieuwe eiwitten potentiële allergenen kunnen zijn. De afgelopen jaren is in diverse gremia gediscussieerd over strategieën voor de beoordeling van genetisch gemodificeerd voedsel op mogelijke allergeniciteit. Deze strategieën kunnen echter niet zonder meer geïmplementeerd worden op andere typen novel foods omdat meestal niet bekend is om welke nieuwe eiwitten het gaat.

Om de allergeniciteit van genetisch gemodificeerd voedsel vast te stellen is in 1996 een beslisboom opgesteld (Metcalfé et al., 1996), die in 2001 door de Food and Agricultural Organization (FAO) samen met de World Health Organization (WHO) is aangepast (Figuur 2).

In deze beslisboom wordt allereerst bepaald of de bron van het nieuw tot expressie gebrachte eiwit allergeen is. Vervolgens wordt bepaald of er sequentie homologie is met bekende allergenen. Dit houdt in dat minimaal zes opeenvolgende aminozuren identiek moeten zijn. De ondergrens van zes aminozuren geeft echter een hoge kans op vals-positieven. Daarnaast zijn voor het opwekken van een allergische reactie tenminste twee IgE-bindende epitopen nodig, dus één enkele overeenkomst in aminozuur sequentie hoeft niet klinisch relevant te zijn. De tertiaire structuur van eiwitten speelt ook een belangrijke rol bij allergeniciteit. Homologie in aminozuur sequentie hoeft dus op zich niet voorspellend te zijn. Als de bron van een gen allergeen is, maar er is geen sequentie homologie, dan wordt het eiwit verder bestudeerd met behulp van specifieke serum screens, waarbij wordt gekeken naar IgE binding door gebruik te maken van serum van individuen met voedselallergie voor het te onderzoeken bron allergeen.



Figuur 2: FAO/WHO beslisboom om allergeniciteit van genetisch gemodificeerd voedsel te bepalen (FAO/WHO 2001).

Als het eiwit van een niet-allergene bron afkomstig is en er geen sequentie homologie wordt gevonden zal een gerichte serum screen worden uitgevoerd met serum samples die hoge titers IgE bevatten gericht tegen allergene verwanten van de bron van het gen. Als deze serum screen negatief is, wordt een eiwit nog verder onderzocht op weerstand tegen pepsine afbraak en kan het nog getest worden in diermodellen. Diermodellen zijn geschikt voor zowel risicoschatting als het vaststellen van potentie van allergenen. Er is echter nog geen gevalideerd experimenteel diermodel voor voedselallergie en niet alle bekende voedselallergenen zijn in staat om allergie te veroorzaken in proefdieren. Er bestaat dus een kans dat allergenen niet worden gedetecteerd, omdat ze geen allergische reacties veroorzaken in proefdieren (en omgekeerd: voor de mens niet-allergene eiwitten zouden in het proefdier een allergische reactie kunnen veroorzaken) Resultaten uit proefdierstudies moeten dus met zorg worden geïnterpreteerd (FAO/WHO, 2001).

Deze beslisboom geeft een voorspelling over de mogelijke allergeniciteit van een nieuw eiwit en lijkt een goed uitgangspunt voor het beoordelen van nieuwe eiwitten in voedsel. Echter,

een aantal punten blijven moeilijk, zoals het gebruik van serum screens, die afhankelijk zijn van serum met hoge IgE titers voor een specifiek allergeen. Standardisatie van serum screens zou kunnen plaatsvinden door gebruik te maken van een goed gekarakteriseerde pool van humaan serum (Bernstein et al., 2003). De beslisboom kan gebruikt worden voor het vaststellen van risico's, dus of een nieuw eiwit een potentieel allergeen is, maar niet voor een risico beoordeling. Additionele gegevens over schattingen van het aantal personen dat een risico loopt en drempelwaarden voor het nieuwe eiwit zijn nodig voor de risicobeoordeling. Echter, dit soort gegevens zullen zeer lastig te verkrijgen zijn (Poulsen, 2004). De uitdagingen voor het vaststellen van allergeniciteit van genetisch gemodificeerd voedsel zijn deels hetzelfde als bij bekende voedselallergenen. Meer inzicht in mechanismen van voedselallergie (met name het sensibilisatie proces) en aspecten als drempelwaarden, dosis-respons relaties en biomarkers voor blootstelling en effect zullen nodig zijn om bestaande methoden te verbeteren (Germolec et al., 2003). Belangrijke informatie kan ook verkregen worden als een product op de markt is door met behulp van postmarketing surveillance de allergeniciteit van genetisch gemodificeerd voedsel te identificeren (Bernstein et al., 2003).

6 CONCLUDERENDE OPMERKINGEN

Hoewel er voor alle te etiketteren voedselallergenen detectiemethoden gepubliceerd of commercieel verkrijgbaar zijn, zijn slechts een paar methoden daadwerkelijk gevalideerd in interlaboratoriumstudies. Commerciële kits lijken voor routinegebruik het meest geschikt omdat deze verkrijgbaar en relatief eenvoudig toepasbaar zijn. Echter deze commerciële kits kunnen pas als volwaardig worden beschouwd wanneer ze gevalideerd zijn in een interlaboratoriumstudie. Bij de validatie van testen zijn gevoeligheid en specificiteit belangrijk. Voor de toepasbaarheid van een test is het vaststellen van een drempelwaarde essentieel. Hiervoor zijn momenteel echter nog onvoldoende klinische gegevens voorhanden. Interlaboratoriumvalidaties zijn al uitgevoerd voor pinda en gluten. Validaties voor pinda zijn uitgevoerd door de Association of Official Analytical Chemists International Research Institute (AOAC-RI). De AOAC-RI heeft drie ELISA kits gevalideerd met een standaard in verschillende voedsel matrices (koekjes, ontbijtgranen, ijs en chocolade). De drie kits zijn goedgekeurd met een detectielimiet in deze matrices van 5 ppm (Poms et al., 2004b). Daarnaast zijn vijf verschillende commerciële ELISA's om pinda in biscuits en donkere chocolade te detecteren gevalideerd in opdracht van de Europese Commissie. Door alle vijf kits kon pinda in de 5-10 ppm range gedetecteerd worden, in de 2-2,5 range konden maar twee kits de hoeveelheid pinda nauwkeurig meten (Poms et al., 2005). Een interlaboratorium validatie voor gluten is uitgevoerd door de Prolamine Working Group (PWG). Voor hazelnoot, koemelk, eieren, vis, schaaldieren, selderie, sesamzaad, soja, en mosterd zijn er wel methoden beschreven of commercieel beschikbaar, echter geen van deze methoden is voldoende gevalideerd.

De European Committee of Standardization (CEN) heeft een werkgroep opgericht (CEN/TC 275/WG 12 "Food Allergens") die zich bezighoudt met validatie en standaardisatie van de beschikbare detectiemethoden voor voedselallergenen. Deze initiatieven zullen op termijn meer informatie opleveren over de bruikbaarheid van de beschikbare methoden. Tevens zullen er in de toekomst waarschijnlijk meer (commerciële) methoden worden ontwikkeld, zodat producten op een betrouwbare en nauwkeurige gescreend en op een juiste wijze gelabeld kunnen worden. Om in de toekomst een voedingsmiddel op een snelle en efficiënte manier op alle te etiketteren voedselallergenen te kunnen onderzoeken is het ontwikkelen van multi-analyte detectiemethoden onontbeerlijk.

DANKBETUIGING

We bedanken Dr. Gert van Duijn voor de informatie over de detectiemethoden die bij TNO Kwaliteit van Leven in Zeist aanwezig of in ontwikkeling zijn.

REFERENTIES

- Akkerdaas, J. H., Wensing, M., Knulst, A. C., Stephan, O., Hefle, S. L., Aalberse, R. C., van Ree, R. (2004). A novel approach for the detection of potentially hazardous pepsin stable hazelnut proteins as contaminants in chocolate-based food. *J Agric Food Chem* 52, 7726-31.
- Aranishi, F., Okimoto, T. (2004). PCR-based detection of allergenic mackerel ingredients in seafood. *J Genet* 83, 193-5.
- Baumgartner, S., Steiner, I., Kloiber, S., Hirmann, D., Krska, R., Yeung, J. (2002). Toward the development of a dipstick immunoassay for the detection of trace amounts of egg protein in food. *Eur Food Res Technol* 214, 168-170.
- Ben Rejeb, S., Abbott, M., Davies, D., Querry, J., Cleroux, C., Streng, C., Delahaut, P., Yeung, J. M. (2003). Immunochemical-based method for detection of hazelnut proteins in processed foods. *J AOAC Int* 86, 557-63.
- Bernstein, J. A., Bernstein, I. L., Bucchini, L., Goldman, L. R., Hamilton, R. G., Lehrer, S., Rubin, C., Sampson, H. A. (2003). Clinical and laboratory investigation of allergy to genetically modified foods. *Environ Health Perspect* 111, 1114-21.
- Besler, M. (2001). Determination of allergens in food. *Trends in analytical chemistry* 20, 662-672.
- Blais, B. W., Phillippe, L. (2001). Detection of hazelnut proteins in foods by enzyme immunoassay using egg yolk antibodies. *J Food Prot* 64, 895-8.
- Bock, S. A., Munoz-Furlong, A., Sampson, H. A. (2001). Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107, 191-193.
- Brett, G. M., Bull, V. J., Morgan, M. R. (1998). Identification of hidden allergens within foods. *Allergy* 53, 109-10.
- Casterline, J. L., Jr., Oles, C. J., Ku, Y. (1999). Measurement of sugars and starches in foods by a modification of the AOAC total dietary fiber method. *J AOAC Int* 82, 759-65.
- Chavez-Servin, J. L., Castellote, A. I., Lopez-Sabater, M. C. (2004). Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J Chromatogr A* 1043, 211-5.
- Codex Alimentarius Commission. (1999). Food labeling - complete texts. Joint FDA/WHO Food Standards Programme (Rome: FAO/WHO).
- EFSA (2004). Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. *The EFSA Journal* 32, 1-197.
- European Commission. (2000). Food Labelling Directive. In *Official Journal*, Vol. L.

- FAO/WHO (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology.
- Food and Drug Administration (2001). Compliance Policy Guide, Sec. 555. 250 Statement of policy for labeling and preventing cross-contact of common food allergens (Washington, DC: FDA).
- Garcia, M. C., Marina, M. L., Torre, M. (1998). Ultrarapid detection of bovine whey proteins in powdered soybean milk by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 822, 225-32.
- Germolec, D. R., Kimber, I., Goldman, L., Selgrade, M. (2003). Key issues for the assessment of the allergenic potential of genetically modified foods: breakout group reports. *Environ Health Perspect* 111, 1131-9.
- Haasnoot, W., Olieman, K., Cazemier, G., Verheijen, R. (2001). Direct biosensor immunoassays for the detection of nonmilk proteins in milk powder. *J Agric Food Chem* 49, 5201-6.
- Hefle, S. L., Jeanniton, E., Taylor, S. L. (2001). Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of egg residues in processed foods. *J Food Prot* 64, 1812-6.
- Hillery, B. R., Elkins, E. R., Warner, C. R., Daniels, D., Fazio, T., Balazs, P., Bosquez, M. H., Chaddha, R., Cordes, S., Couture, K., et al. (1989). Optimized Monier-Williams method for determination of sulfites in foods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 72, 470-5.
- Hird, H., Lloid, J., Goodier, R., Brown, J., Reece, P. (2003). Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction. *Eur Food Res Technol* 217, 265-268.
- Hlywka, J. J., Hefle, S. L., Taylor, S. L. (2000). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of almonds in foods. *J Food Prot* 63, 252-7.
- Holzhauser, T., Vieths, S. (1999). Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein in complex food matrices. *J Agric Food Chem* 47, 603-11.
- Holzhauser, T., Dehne, L. I., Hoffmann, A., Hausteiner, D., Vieths, S. (1998). Rocket immunoelectrophoresis (RIE) for determination of potentially allergenic peanut proteins in processed foods as a simple means for quality assurance and food safety. *Z Lebensm Unters Forsch A* 206, 1-8.
- Holzhauser, T., Stephan, O., Vieths, S. (2002). Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: a comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich-ELISA. *J Agric Food Chem* 50, 5808-15.

- Hurst, W. J., Krout, E. R., Burks, W. R. (2002). A comparison of commercially available peanut ELISA test kits on the analysis of samples of dark and milk chocolate. *J Immunoassay Immunochem* 23, 451-9.
- Jeoung, B. J., Reese, G., Hauck, P., Oliver, J. B., Daul, C. B., Lehrer, S. B. (1997). Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *J Allergy Clin Immunol* 100, 229-34.
- Kiening, M., Niessner, R., Drs, E., Baumgartner, S., Krska, R., Bremer, M., Tomkies, V., Reece, P., Danks, C., Immer, U., Weller, M. G. (2005). Sandwich Immunoassays for the Determination of Peanut and Hazelnut Traces in Foods. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3321-3327.
- Koppelman, S. J., Knulst, A. C., Koers, W. J., Penninks, A. H., Peppelman, H., Vlooswijk, R., Pigmans, I., van Duijn, G., Hessing, M. (1999). Comparison of different immunochemical methods for the detection and quantification of hazelnut proteins in food products. *J Immunol Methods* 229, 107-20.
- Koppelman, S. J., Lakemond, C. M., Vlooswijk, R., Hefle, S. L. (2004). Detection of soy proteins in processed foods: literature overview and new experimental work. *J AOAC Int* 87, 1398-407.
- Makinen-Kiljunen, S., Palosuo, T. (1992). A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of bovine beta-lactoglobulin in infant feeding formulas and in human milk. *Allergy* 47, 347-52.
- Metcalf, D. D. (1985). Food allergens. *Clin Rev Allergy* 3, 331-49.
- Metcalf, D. D., Astwood, J. D., Townsend, R., Sampson, H. A., Taylor, S. L., Fuchs, R. L. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 36 Suppl, S165-86.
- Mills, C., Pott, A., Plumb, G. W., Lambert, N., Morgan, M. R. A. (1997). Development of a rapid dipstick immuoassay for the detection of peanut contamination in food. *Food and agricultural immunology* 9, 37-50.
- Molina, E., Amigo, L., Ramos, M. (1998). Detection of bovine milk proteins in soymilk by Western blotting. *J Food Prot* 61, 1691-4.
- Negroni, L., Bernard, H., Clement, G., Chatel, J. M., Brune, P., Frobert, Y., Wal, J. M., Grassi, J. (1998). Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured beta-lactoglobulin. *J Immunol Methods* 220, 25-37.
- Nogueira, M. C., McDonald, R., Westphal, C., Maleki, S. J., Yeung, J. M. (2004). Can commercial peanut assay kits detect peanut allergens? *J AOAC Int* 87, 1480-4.
- Plebani, A., Restani, P., Naselli, A., Galli, C. L., Meini, A., Cavagni, G., Ugazio, A. G., Poiesi, C. (1997). Monoclonal and polyclonal antibodies against casein components of

- cow milk for evaluation of residual antigenic activity in 'hypoallergenic' infant formulas. *Clin Exp Allergy* 27, 949-56.
- Pomes, A., Helm, R. M., Bannon, G. A., Burks, A. W., Tsay, A., Chapman, M. D. (2003). Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *J Allergy Clin Immunol* 111, 640-5.
- Poms, R. E., Agazzi, M. E., Bau, A., Brohee, M., Capelletti, C., Norgaard, J. V., Anklam, E. (2005). Inter-laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate. *Food Addit Contam* 22, 104-12.
- Poms, R. E., Anklam, E., Kuhn, M. (2004a). Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *J AOAC Int* 87, 1391-7.
- Poms, R. E., Klein, C. L., Anklam, E. (2004b). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam* 21, 1-31.
- Poulsen, L. K. (2004). Allergy assessment of foods or ingredients derived from biotechnology, gene-modified organisms, or novel foods. *Mol Nutr Food Res* 48, 413-23.
- Roux, K. H., Teuber, S. S., Robotham, J. M., Sathe, S. K. (2001). Detection and stability of the major almond allergen in foods. *J Agric Food Chem* 49, 2131-6.
- Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113, 805-819.
- Shefcheck, K. J., Musser, S. M. (2004). Confirmation of the allergenic peanut protein, Ara h 1, in a model food matrix using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *J Agric Food Chem* 52, 2785-90.
- Sicherer, S. H. (2002). Food allergy. *Lancet* 360, 701-10.
- Sorell, L., Lopez, J. A., Valdes, I., Alfonso, P., Camafeita, E., Acevedo, B., Chirido, F., Gavilondo, J., Mendez, E. (1998). An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Lett* 439, 46-50.
- Stephan, M. A., Lehmann, Holzhauser, Vieths (2002). Development and validation of two dipstick type immunoassays for determination of trace amounts of peanut and hazelnut in processed foods. *European Food Research and Technology* 215, 431-436.
- Stephan, O., Vieths, S. (2004). Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. *J Agric Food Chem* 52, 3754-60.
- Taylor, A. V., Swanson, M. C., Jones, R. T., Vives, R., Rodriguez, J., Yunginger, J. W., Crespo, J. F. (2000). Detection and quantitation of raw fish aeroallergens from an open-air fish market. *J Allergy Clin Immunol* 105, 166-9.

- Valdes, I., Garcia, E., Llorente, M., Mendez, E. (2003). Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15, 465-74.
- Van Loveren, H., Ezendam J. Drepmeelwaarden bij voedselallergie. RIVM rapport 340330001, Bilthoven, 2006.
- Wei, Y., Sathe, S. K., Teuber, S. S., Roux, K. H. (2003). A sensitive sandwich ELISA for the detection of trace amounts of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut in foods. *J Agric Food Chem* 51, 3215-21.
- Yamashita, H., Kimoto, M., Hiemori, M., Okita, M., Suzuki, K., Tsuji, H. (2001). Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay system for micro-detection of the wheat allergen, Tri a Bd 17 K. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 2730-4.
- Yeung, J. M., and Collins, P. G. (1996). Enzyme immunoassay for determination of peanut proteins in food products. *J AOAC Int* 79, 1411-6.
- Yeung, J. M., Newsome, W. H., Abbott, M. A. (2000). Determination of egg proteins in food products by enzyme immunoassay. *J AOAC Int* 83, 139-43.