



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Οπτικοί ανοσοαισθητήρες για την ταυτόχρονη ανίχνευση
αλλεργιογόνων ουσιών σε τρόφιμα**

**ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ ΜΙΧΑΗΛΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2017



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

DOCTORAL DISSERTATION

**Optical immunosensors for the simultaneous detection
of allergens in food**

**ANFELOPOULOU MICHAILIA
CHEMIST**

ATHENS

NOVEMBER 2017

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Οπτικοί ανοσοαισθητήρες για την ταυτόχρονη ανίχνευση αλλεργιογόνων ουσιών σε τρόφιμα

ΜΙΧΑΗΛΙΑ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ

A.M.: 001209

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδαη , Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδαη, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας Ε.Κ.Π.Α.
Παναγιώτα Πέτρου , Ερευνήτρια Α΄ , Ε.Κ.Ε.Φ.Ε “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”
Σπυρίδων Κοΐνης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αθανάσιος Γκιμήσης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.
Παναγιώτα Πέτρου , Ερευνήτρια Α΄ , Ε.Κ.Ε.Φ.Ε “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”
Σπυρίδων Κοΐνης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.
Αντώνιος Καλοκαιρινός, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.
Αναστάσιος Οικονόμου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.
Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
Σωτήριος Κακαμπάκος, Ερευνητής Α΄ , Ε.Κ.Ε.Φ.Ε “ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ”

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 13/11/2017

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλοί αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, άρθρο 202).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τροφική αλλεργία επηρεάζει μεγάλο ποσοστό των ανθρώπων παγκοσμίως. Για το λόγο αυτό, διεθνείς οργανισμοί έχουν θεσπίσει κανόνες τόσο για τον έλεγχο παρουσίας αλλεργιογόνων όσο και για την υποχρεωτική αναγραφή τους στις ετικέτες των επεξεργασμένων προϊόντων εκ μέρους των βιομηχανιών τροφίμων. Για την αποφυγή ανεπιθύμητης επιμόλυνσης των τροφίμων με αλλεργιογόνα λόγω της χρήσης κοινών γραμμών παραγωγής για διαφορετικά προϊόντα είναι απαραίτητος ο έλεγχος παρουσίας αλλεργιογόνων τόσο στο νερό καθαρισμού/έκπλυσης των σωληνώσεων και μηχανών όσο και στα ίδια τα τελικά προϊόντα και τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης σε νερό έκπλυσης σωληνώσεων από βιομηχανίες τροφίμων σε πραγματικό χρόνο, μέσω οπτικού ανοσοαισθητήρα χωρίς τη χρήση ιχνηθετών. Ο οπτικός ανοσοαισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν πλήρως ολοκληρωμένος σε ψηφίδες πυριτίου και περιλάμβανε συστοιχία δέκα συμβολομέτρων Mach-Zehnder (MZI) καθώς και τις αντίστοιχες οπτικές πηγές παρέχοντας τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών αναλυτών στο ίδιο δείγμα. Για την επίτευξη του στόχου, αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί (ELISA) για όλα τα στοχευόμενα αλλεργιογόνα καθώς και μέθοδοι ανίχνευσης μονού και πολλαπλών αναλυτών με τον αισθητήρα. Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι ταυτόχρονου προσδιορισμού των αλλεργιογόνων ήταν ταχείες (6,5 min) και ακριβείς με όρια ανίχνευσης εφάμιλλα ή χαμηλότερα των εμπορικά διαθέσιμων μεθόδων που χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες. Η δυνατότητα εφαρμογής του αισθητήρα σε πραγματικές συνθήκες αξιολογήθηκε μέσω ανάλυσης δειγμάτων νερού έκπλυσης σωληνώσεων γαλακτοβιομηχανίας και διαπιστώθηκε ότι οι τιμές που προσδιορίστηκαν ήταν σε καλή συμφωνία με αυτές που ελήφθησαν τόσο με τις μεθόδους ELISA που αναπτύχθηκαν όσο και από εξωτερικά διεθνή εργαστήρια. Επιπλέον, ο αισθητήρας αξιοποιήθηκε για την ανίχνευση νοθείας κασικίσιου γάλακτος με αγελαδινό, μέσω προσδιορισμού βοείου κ-καζεΐνης, και παρείχε αξιόπιστες και ταχείες (5 min) μετρήσεις με ευαισθησία ανίχνευσης <0,1% (ο/ο).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανίχνευση αλλεργιογόνων με ανοσοαισθητήρα

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: αλλεργιογόνες πρωτεΐνες, ELISA, ανοσοαισθητήρας

ABSTRACT

Food allergy affects a large percentage of people worldwide. For this reason, international organizations have addressed directives which make mandatory the control and labeling of processed products so as to indicate the presence of allergenic compounds by the food industries. In order to avoid undesirable contamination of food with allergens due to the use of common production lines for different products, it is necessary to control the presence of allergens in both the rinsing water of pipelines and machines, the finished products and the raw materials used as well. The purpose of this PhD dissertation was to develop an optical immunosensor for the simultaneous, real-time, label-free determination of κ -casein, peanut protein, soy protein and gliadin in rinsing water from food industry. The immunosensor was based on an optoelectronic platform fully integrated onto silicon chips and comprised an array of ten Mach-Zehnder (MZI) interferometers along with the corresponding optical sources, enabling the simultaneous detection of multiple analytes in the same sample. To achieve this goal, enzyme-immunoassays (ELISAs) were developed and optimized for all target allergens as well as methods for single and multiple analytes detection with the sensor. The methods developed for the simultaneous determination of allergens were fast (6.5 min) and accurate with detection limits equal to or lower than those provided by the commercially available kits used by food industry. The potential of the sensor to perform in real conditions was evaluated by analyzing rinsing water samples from a dairy industry and it was found that the results were in good agreement with those obtained by the ELISA methods developed or provided by external international analytical laboratories. In addition, due to its excellent performance for allergen detection in rinsing water, the immunosensor was also evaluated for the detection of goat milk adulteration with cow milk (through bovine κ -casein determination). The immunosensor developed found to be reliable and rapid (5 min) with high detection sensitivity ($<0.1\%$, v / v).

SUBJECT AREA: Allergens detection by immunosensor

KEYWORDS: allergens, ELISA, immunosensor

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2012-2017 στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», υπό την επίβλεψη της Δρ. Π. Πέτρου, Ερευνήτριας Α΄ Βαθμίδας του Ινστιτούτου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Δρ. Α. Σιαφάκα-Καπάδα και το Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. και υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Σ. Κοΐνη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για τη διάθεση της εργαστηριακής υποδομής προκειμένου να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία. Επίσης, ευχαριστώ την Ευρωπαϊκή Ένωση για τη χρηματοδότηση μέρους της παρούσας διατριβής μέσω του προγράμματος «FOODSNIFFER».

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδω στη Διευθύντρια Ερευνών του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α., Δρ. Π. Πέτρου και το Διευθυντή Ερευνών του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. Δρ. Σ. Κακαμπάκο, οι οποίοι πριν από οχτώ χρόνια με εμπιστεύθηκαν ως μέλος της επιστημονικής τους ομάδας και μου ανέθεσαν το θέμα της Διδακτορικής Διατριβής. Κατά τη διάρκεια της Διατριβής μου είχα τη συνεχή καθοδήγηση και την επίβλεψή τους με αμείωτο ενδιαφέρον. Οι παρατηρήσεις τους και η βοήθειά τους ήταν καθοριστικοί παράγοντες για την εκπόνηση της εργασίας μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους Διευθυντές Ερευνών του Ινστιτούτου Νανοτεχνολογίας και Νανοεπιστήμης, Δρ. Κ. Μισιακό και Δρ. Ι. Ράππη για την κατασκευή της διάταξης του βιοαισθητήρα, καθώς και για τις συμβουλές τους καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διευθυντή Ερευνών του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. Δρ. Ι. Χριστοφίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις πολύτιμες συμβουλές του.

Επιπλέον ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ευχαριστώ θερμά το Δρ. Δ. Γκίκα και τη Δρ. Κ. Καλατζή από τη Διεύθυνση Διασφάλισης Ποιότητας της εταιρείας ΔΕΛΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ Α.Ε. για τη συνεργασία τους και ιδιαίτερα για την παροχή δειγμάτων γάλακτος και νερού έκπλυσης σωληνώσεων από τις γεμιστικές μηχανές της εταιρείας, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση του αισθητήρα της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλο το προσωπικό του εργαστηρίου και πιο συγκεκριμένα τη Δρ. Α. Μπούρκουλα, το Δρ. Χ. Κόκκινο, το Δρ. Κουκουβίνο και τη Δρ. Α. Ψαρούλη, καθώς και τους υποψηφίους διδάκτορες Α. Κανιούρα, Β. Πάγκαλη, Ε. Σταύρα, Δ. Τσουνίδα και Β. Αναστασιάδη, με τους οποίους δημιουργήσαμε ένα εξαιρετικό περιβάλλον εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τους συνεργάτες μου από το Ι.Ν.Ν. και συγκεκριμένα τον Α. Μποτσιάλα ως προς τα τεχνικά ζητήματα του ανοσοαισθητήρα, τον Α. Σαλαπάτα για την κατασκευή κατάλληλου λογισμικού για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του αισθητήρα, καθώς επίσης την υποψήφια διδάκτορα Γ. Κάπρου για τη συνεχή στήριξή της.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και τα άτομα που βρίσκονται δίπλα μου καθημερινά για τη στήριξη και την ανοχή τους.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου, η οποία βρίσκεται στο πλευρό μου σε κάθε βήμα της ζωής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	33
ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑ.....	33
1.1 Εισαγωγή	33
1.2 Τροφική αλλεργία	33
1.2.1 Ορισμός και κατηγορίες αλλεργικής απόκρισης σε τρόφιμα.....	33
1.2.2 Άμεσου τύπου αλλεργική απόκριση	34
1.2.3 Συμπτώματα αλλεργικής απόκρισης.....	35
1.2.4 Πρόληψη και αντιμετώπιση της τροφικής αλλεργίας	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	37
ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	37
2.1 Ιδιότητες και κατηγορίες αλλεργιογόνων τροφίμων	37
2.2 Αγελαδινό Γάλα	39
2.2.1 Σύσταση αγελαδινού γάλακτος	39
2.2.2 Καζεΐνες	39
2.2.3 Γάλα από διαφορετικά είδη θηλαστικών και νοθεία.....	41
2.3 Φιστίκι	43
2.3.1 Σύσταση και αλλεργιογόνες πρωτεΐνες φιστικιού	43
2.3.2 Αλλεργική απόκριση στο φιστίκι.....	45
2.4 Σόγια	45
2.4.1 Σύσταση και αλλεργιογόνες πρωτεΐνες της σόγιας	46
2.4.2 Αλλεργική απόκριση στη σόγια	47
2.5 Σιτάρι.....	48
2.5.1 Πρωτεΐνες σιταριού	48
2.5.2 Αλλεργία στο σιτάρι.....	49
2.5.3 Δυσανεξία στη γλουτένη ή κοιλιοκάκη.....	50
2.6 Σημαντικότητα ανίχνευσης των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών	52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	55
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	55
3.1 Μέθοδοι ανίχνευσης αλλεργιογόνων πρωτεϊνών.....	55
3.2 Ηλεκτροφορητικές και ανοσοηλεκτροφορητικές τεχνικές.....	55
3.2.1 Ανοσο-ηλεκτροφόρηση πύραυλος (RIE).....	55
3.2.2 SDS PAGE/Ανοσοαποτύπωση.....	56
3.3 Υγρή χρωματογραφία/ HPLC-MS.....	56
3.4 Μέθοδοι ανίχνευσης DNA.....	59
3.5 Ανοσοχημικές μέθοδοι.....	62
3.5.1 Ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση.....	62
3.5.2 Ανοσοχρωματογραφικές συσκευές πλευρικής ροής και ταινίες εμβάπτισης	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	67
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	67
4.1 Εισαγωγή στους Βιοαισθητήρες	67
4.2 Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες.....	68
4.3 Πιεζοηλεκτρικοί ή ακουστικοί αισθητήρες.....	71
4.4 Οπτικοί βιοαισθητήρες.....	73
4.5.1 Οπτικοί ανοσοαισθητήρες με χρήση ιχνηθετών	74
4.5.2 Οπτικοί ανοσοαισθητήρες χωρίς τη χρήση ιχνηθέτη	77
4.5.2.1 Δακτυλιοειδείς ταλαντωτές.....	77
4.5.2.2 Ανοσοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων	79
4.5.2.3 Συμβολομετρικοί αισθητήρες	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	87
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	89
ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ.....	89
6.1 ΥΛΙΚΑ.....	89
6.2 ΟΡΓΑΝΑ.....	91

6.3 Παρασκευή συζευγμάτων πρωτεϊνών με βιοτίνη (βιοτινυλίωση).....	92
6.4 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων	93
6.4.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων κ- καζεΐνης, πρωτεΐνης φιστικιού, πρωτεΐνης σόγιας και γλιαδίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα.....	93
6.4.2 Παρασκευή προτύπων αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα.....	94
6.5 Ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί.....	94
6.5.1 Ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικός προσδιορισμός κ- καζεΐνης, πρωτεΐνης φιστικιού, πρωτεΐνης σόγιας και γλιαδίνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης	95
6.5.2 Ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης	97
6.6 Μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός της κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης	97
6.7 Μέθοδος υδροφιλοποίησης και χημικής τροποποίησης των ψηφίδων πυριτίου με αμινο-σιλάνιο.....	99
6.8 Ακίνητοποίηση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε ψηφίδες πυριτίου-αισθητήρες	100
6.9 Ανίχνευση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα τύπου Mach-Zehnder.....	104
6.10 Ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα τύπου Mach-Zehnder.	108
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	109
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	109
7.1 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου ανοσοενζυμικού προσδιορισμού της βοείου κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης	109
7.1.1 Επιλογή των ειδικών αντισωμάτων έναντι των τεσσάρων αλλεργιογόνων καθώς και βελτιστοποίηση της συγκέντρωσή τους- Βελτιστοποίηση της συγκεντρώσεως του ακίνητοποιημένου αλλεργιογόνου	110
7.1.2 Βελτιστοποίηση σύνθεσης διαλυμάτων ανοσοενζυμικού προσδιορισμού της βοείου κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης.....	118

7.1.3 Χρονική μελέτη ανοσοαντιδράσεων	126
7.1.4 Χρονική μελέτη της αντίδρασης των αντισωμάτων έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού/κουνελιού με τα ειδικά αντισώματα έναντι των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών	127
7.1.5 Διερεύνηση επίδρασης της προεπάσης στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης.....	129
7.1.6 Διερεύνηση της επίδρασης της μήτρας του δείγματος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό.....	130
7.1.7 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης σε φρεάτια μικροπιλοδότσης	131
7.2 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ανοσοχημικού προσδιορισμού βοείου κ-καζεΐνης, πρωτεΐνης φιστικιού, πρωτεΐνης σόγιας και γλιαδίνης με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.....	134
7.2.1 Επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης αλλεργιογόνου πρωτεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης	135
7.2.2 Μελέτη δυνατότητας απομάκρυνσης των ειδικών αντισωμάτων από τις ακινητοποιημένες στην ψηφίδα πυριτίου αλλεργιογόνες πρωτεΐνες.....	138
7.2.3 Επιλογή των ειδικών αντισωμάτων έναντι των τεσσάρων αλλεργιογόνων καθώς και βελτιστοποίηση της συγκέντρωσή τους	140
7.2.4 Μελέτη της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης	142
7.2.5 Μελέτη της χρονικής διάρκειας της αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με τα ειδικά αντισώματα έναντι των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών.....	143
7.2.6 Επιλογή της διαμόρφωσης της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας.....	144
7.2.7 Διερεύνηση της επίδρασης της προεπάσης στον ανοσοχημικό προσδιορισμό με οπτικό ανοσοαισθητήρα.....	148
7.2.8 Διερεύνηση της επίδρασης της μήτρας του δείγματος στον ανοσοχημικό προσδιορισμό με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.....	149
7.2.9 Ταυτόχρονος προσδιορισμός των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών.....	151

7.2.10 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ταυτόχρονου ανοσοχημικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα	152
7.2.11 Ανάλυση δειγμάτων με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα και σύγκριση με τους αντίστοιχους ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης	159
7.2.12 Αναγέννηση των ψηφίδων και σταθερότητά τους κατά τη φύλαξη	161
7.3 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου ανοσοενζυμικού προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης και οπτικό ανοσοαισθητήρα	164
7.3.1 Ανάπτυξη ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο ή πρόβειο γάλα	165
7.3.1.1 Επίδραση της αραίωσης του κασικίσιου γάλακτος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου	165
7.3.1.2 Επίδραση της θερμικής κατεργασίας του κασικίσιου και του αγελαδινού γάλακτος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου.....	166
7.3.1.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα	168
7.3.2 Ανάπτυξη ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα	170
7.3.2.1 Επιλογή του αντισώματος για την επικάλυψη των φρεατίων μικροτιπλοδότησης και της βέλτιστης συγκέντρωσής του.....	170
7.3.2.2 Επίδραση του Tween 20 στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα	172
7.3.2.3 Επίδραση της αραίωσης του κασικίσιου γάλακτος στον μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης	173
7.3.2.4 Επίδραση της θερμικής κατεργασίας του κασικίσιου και του αγελαδινού γάλακτος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου.....	175

7.3.2.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα	176
7.3.2.6 Σύγκριση αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με τον ανταγωνιστικού και τον μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα, σε φρεάτια μικροπιλοδότησης.	177
7.4 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου ανοσοχημικού προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο ή πρόβειο γάλα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.....	177
7.4.1 Επιλογή του βέλτιστου διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων και μήτρας παρασκευής των προτύπων διαλυμάτων	178
7.4.3 Μελέτη της επίδρασης της μήτρας του δείγματος.....	179
7.4.4 Χρονική μελέτη της ανοσοαντίδρασης.....	180
7.4.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοχημικού προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα	182
7.4.6 Ανάλυση δειγμάτων πρόβειου γάλακτος ως προς την περιεκτικότητά τους σε αγελαδινό γάλα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα και σύγκριση με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροπιλοδότησης.....	185
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	187
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	187
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	199
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	201
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	205

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 33-4G10 (■) και 33-6A10 (●). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 108
- Σχήμα 2: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο (■) και για το πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 250 ng/mL (●) με το αντίσωμα: Α) 33-4G10, και Β) 33-6A10 συναρτήσει της συγκέντρωσης της κ-καζεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 109
- Σχήμα 3: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης φιστικιού συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 51-5G9 (■), 44-4G2 (●), 51-6A12 (▲), 44-8G7 (▼) και 51-12D2 (◀). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 110
- Σχήμα 4: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο (■) και για το πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης φιστικιού συγκέντρωσης 250 ng/mL (●) με το αντίσωμα: Α) 51-5G9, Β) 44-4G2, Γ) 51-6A12, Δ) 44-8G7 και Ε) 51-12D2, συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 111
- Σχήμα 5: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για μηδενικό πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης σόγιας συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 26-6C9 (■) και 26-5G4 (●). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 113
- Σχήμα 6: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο (■) και για πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης σόγιας συγκεντρώσεως 250 ng/mL (●) με το αντίσωμα: Α) 26-6C9, και Β) 26-5G4 συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σόγιας στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών

μετρήσεων \pm SD..... 113

Σχήμα 7: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος G-9144 και για τις συγκεντρώσεις γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης: 0,25 μ g/mL (■), 0,5 μ g/mL (●), 1 μ g/mL (▲), 2 μ g/mL (▼), 5 μ g/mL (◀) και 10 μ g/mL (▶). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 115

Σχήμα 8: A) Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης συγκεντρώσεως 1 μ g/mL ως προς το μηδενικό πρότυπο για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισώματος G-9144 σε συνδυασμό με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης. B) Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο (■) και για πρότυπο διάλυμα συγκεντρώσεως γλιαδίνης 1 μ g/mL (●) για αραίωση του αντισώματος G9144 1:2000. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 116

Σχήμα 9: A) Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0, 200, 500 και 1000 ng/mL όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl (■) και Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl (●). B) Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL με τα δύο διαλύματα ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 117

Σχήμα 10: A) Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο και για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl χωρίς Tween 20 (■), το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με 0,05% (ο/ο) Tween 20 (●) και το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με 0,5% (ο/ο) Tween 20 (▲). B) Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης

συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL για τα τρία διαλύματα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 118

Σχήμα 11: A) Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο και για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10 mM, pH 7,4 που περιέχει 0,9% (β/ο) NaCl με 0,05% (ο/ο) Tween 20 και: 0,5% (β/ο) BSA (■), 1% (β/ο) BSA (●), 0,5% (β/ο) οαλβουμίνη (▲) ή 1% (β/ο) οαλβουμίνη (▼). B) Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL με τα ανωτέρω διαλύματα ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 120

Σχήμα 12: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης (■), το πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης 500 ng/mL (●) και τη μη ειδική δέσμευση (▲) όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: A) ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς Tween 20 σε όλα τα στάδια ανοσοπροσδιορισμού, B) ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,05% (ο/ο) Tween 20 σε όλα τα στάδια μετά την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης, Γ) ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,05% (ο/ο) Tween 20 σε όλα τα στάδια μετά τον αποκλεισμό των ελευθέρων θέσεων, Δ) ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,05% (ο/ο) Tween 20 σε όλα τα στάδια μετά την ανοσοαντίδραση και E) ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,05% (ο/ο) Tween 20 στο στάδιο μετά την επώαση με το διάλυμα του δευτέρου αντισώματος. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 121

Σχήμα 13: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης σόγιας συγκέντρωσης 250, 100 και 2000 ng/mL πρωτεΐνης σόγιας όταν ως διάλυμα ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκε: ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9,2 (■), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 (●), ή ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 123

Σχήμα 14: Καμπύλες βαθμονόμησης πρωτεΐνης φιστικιού που ελήφθησαν

χρησιμοποιώντας ως διάλυμα αποκλεισμού: ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5, 1% BSA (β/ο) (P. Δ. 1) (■), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, 1% BSA (β/ο) (P. Δ. 2) (●), ή ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, 1% BSA (β/ο) (P.Δ. 3) (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 124

Σχήμα 15: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για τα μηδενικά πρότυπα διαλύματα καζεΐνης (■), πρωτεΐνης φιστικιού (●), πρωτεΐνης σόγιας (▲) και γλιαδίνης (▼) συναρτήσεως της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 125

Σχήμα 16: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται Α) για μηδενικά πρότυπα διαλύματα καζεΐνης (■), πρωτεΐνης φιστικιού (●), πρωτεΐνης σόγιας (▲), συναρτήσεως του χρόνου αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού και Β) για μηδενικό πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης (▼) συναρτήσεως του χρόνου αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού με τα ειδικά για κάθε αναλύτη αντισώματα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 126

Σχήμα 17: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,10 μg/mL σε κ-καζεΐνη, 0,25 μg/mL σε πρωτεΐνη φιστικιού, 0,25 μg/mL σε πρωτεΐνη σόγιας και 0,10 μg/mL σε γλιαδίνη ως προς τα αντίστοιχα μηδενικά πρότυπα διαλύματα όταν δεν έχει πραγματοποιηθεί προεπώαση των προτύπων διαλυμάτων με τα ειδικά έναντι των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών αντισώματα (κόκκινες στήλες) και όταν έχει πραγματοποιηθεί προεπώαση για 60 min (μπλε στήλες). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 127

Σχήμα 18: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο καθώς και για πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης σόγιας συγκέντρωσης 50, 250 και 500 ng/mL τα οποία έχουν παρασκευαστεί: σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης (■), σε νερό δικτύου (●), σε μίγμα νερού δικτύου/διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε αναλογία 50:50 (▲) και σε μίγμα νερού δικτύου/ διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε αναλογία 20:80 (▼). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 129

Σχήμα 19: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης της: Α) κ-καζεΐνης, Β) ολικής καζεΐνης, Γ) πρωτεΐνης φιστικιού, Δ) πρωτεΐνη σόγιας και Ε) γλιαδίνης που ελήφθησαν με το τελικό πρωτόκολλο ανοσοενζυμικού προσδιορισμού σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 130

Σχήμα 20: Τιμές αναλυτικού σήματος (ακτίνια) που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο κ-καζεΐνης με το αντίσωμα 33-4G10 από ψηφίδες που είχαν επικαλυφθεί με διάλυμα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 5, 10,20, 50, 100 και 200 μ g/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 133

Σχήμα 21: Τιμές αναλυτικού σήματος (ακτίνια) που ελήφθησαν για την: Α) κ-καζεΐνη με τα δύο διαφορετικά αντισώματα (33-4G10 και 33-6A10), Β) πρωτεΐνη φιστικιού με τα πέντε διαφορετικά αντισώματα (44-4G2, 44-8G7, 51-5G9, 51-12D2, και 51-6A12), Γ) πρωτεΐνη σόγιας με τα δύο διαφορετικά αντισώματα (25-5G4, 26-6C9) και Δ) γλιαδίνη με το αντίσωμα G-9144 για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα (μαύρες στήλες) και για το υπόλειμμα μετά την αναγέννηση με: εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα έκλουσης IgG (κόκκινες στήλες), ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M γλυκίνης/HCl, pH 2,5 (μπλε στήλες), διάλυμα NaOH 40 mM (κίτρινες στήλες), ή διάλυμα HCl 50 mM (ροζ στήλες). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.... 137

Σχήμα 22: Τιμές αναλυτικού σήματος (ακτίνια) που λαμβάνονται για μηδενικό πρότυπο διάλυμα Α) γλιαδίνης συναρτήσει της αραίωσης του αντισώματος G-9144, Β) κ-καζεΐνης συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 33-4G10 (■), 33-6A10 (●), ή μίγματος αυτών σε αναλογία 1:1 (▲), Γ) πρωτεΐνης φιστικιού συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 44-4G2 (■), 51-5G9 (●), ή μίγματος αυτών σε αναλογία 1:1 (▲) και Δ) πρωτεΐνης σόγιας συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 26-5G4 (■), 26-6C9 (●), ή μίγματος αυτών σε αναλογία 1:1 (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 139

Σχήμα 23: Μεταβολή του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα συναρτήσει της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης

- για την: πρωτεΐνη φιστικιού (■), πρωτεΐνη σόγιας (●), γλιαδίνη (▲) και κ-καζεΐνη (▼)..... 141
- Σχήμα 24: Μεταβολή του σήματος που ελήφθη για μηδενικό πρότυπο διάλυμα συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με τα ειδικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης σόγιας (●), κ-καζεΐνης (▲) γλιαδίνης (■) και πρωτεΐνης φιστικιού (▼). Η διάρκεια του πρώτου σταδίου της ανοσοανάλυσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 5 min..... 142
- Σχήμα 25: Αναλυτικό σήμα (ακτίνια) που ελήφθη ενδεικτικά για Α) την κ-καζεΐνη και Β) την πρωτεΐνη σόγιας, με τη μικρορευστομηχανική κυψελίδα τύπου Α (■), τύπου Β (●) και τύπου Γ (▲) συναρτήσει της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 144
- Σχήμα 26: Αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν από 7 MZIs της ίδιας ψηφίδα που είχαν τροποποιηθεί με Α) κ-καζεΐνη, Β) πρωτεΐνη φιστικιού, Γ) πρωτεΐνη σόγιας ή Δ) γλιαδίνη κατά τη διαδοχική διαβίβαση: διαλύματος ανοσοαντίδρασης (αρχή→1), μίγματος μηδενικού προτύπου/ειδικών αντισωμάτων έναντι της κάθε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης (1→2) και διαλύματος δευτέρου αντισώματος (2→τέλος). Σε όλες τις περιπτώσεις τα 3 εναπομείναντα MZIs είχαν τροποποιηθεί με BSA για την λήψη του σήματος μη ειδικής δέσμευσης (τυφλό)..... 145
- Σχήμα 27: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης: 0,5 μ g/mL σε κ-καζεΐνη, 6 μ g/mL σε πρωτεΐνη φιστικιού, 4 μ g/mL σε πρωτεΐνη σόγιας και 0,5 μ g/mL σε γλιαδίνη ως προς τα αντίστοιχα μηδενικά πρότυπα όταν δεν έχει πραγματοποιηθεί προεπάση των προτύπων διαλυμάτων με τα ειδικά έναντι των πρωτεϊνών αντισώματα (■) ή όταν έχει πραγματοποιηθεί προεπάση για 10 min (■), 30 min (■) ή για 60 min (■). Κάθε στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 147
- Σχήμα 28: Απόκριση που ελήφθη σε πραγματικό χρόνο για μηδενικό πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης που είχε παρασκευαστεί σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης (κόκκινο βέλος) ή σε νερό δικτύου (μπλε βέλος)..... 148
- Σχήμα 29: Αποκρίσεις που ελήφθησαν από ψηφίδα στην οποία κυματοδηγοί

είχαν τροποποιηθεί ανά δύο με καθεμία από τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες ή BSA όπως φαίνεται στην λεζάντα κατά την διαδοχική διαβίβαση των αντίστοιχων μηδενικών προτύπων (άνω βέλη). Μεταξύ των διαφορετικών μηδενικών προτύπων πραγματοποιείτο αναγέννηση της επιφάνειας της ψηφίδας (κάτω βέλη).....	150
Σχήμα 30: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης ανοσοχημικού προσδιορισμού της: Α) κ-καζεΐνης, Β) ολικής καζεΐνης, Γ) πρωτεΐνης φιστικιού, Δ) πρωτεΐνης σόγιας και Ε) γλιαδίνης, με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 2 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.....	151
Σχήμα 31: Συσχέτιση των αναμενόμενων συγκεντρώσεων με τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις: Α) καζεΐνης που ελήφθησαν με διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων των οποίων η αρχική συγκέντρωση ήταν 4,5 μ g/mL (■), 3 μ g/mL (●) και 1,2 μ g/mL (▲), Β) πρωτεΐνης φιστικιού όταν η αρχική συγκέντρωση ήταν: 17 μ g/mL (■), 14 μ g/mL (●) και 9 μ g/mL (▲), Γ) πρωτεΐνης σόγιας όταν η αρχική συγκέντρωση ήταν: 15 μ g/mL (■), 11 μ g/mL (●) και 9 μ g/mL (▲) και Δ) γλιαδίνης όταν η αρχική συγκέντρωση ήταν: 15 μ g/mL (■), 7 μ g/mL (●) και 2,5 μ g/mL (▲) . Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 2 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.....	156
Σχήμα 32: Τιμές που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης (■), πρωτεΐνης σόγιας (●), πρωτεΐνης φιστικιού (▲) και γλιαδίνης (▼), αντίστοιχα, σε επαναλαμβανόμενους κύκλους ανοσοανάλυσης/ αναγέννησης. Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή των είκοσι μετρήσεων για την κ-καζεΐνη και τη γλιαδίνη και των δώδεκα πρώτων μετρήσεων για την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας.....	160
Σχήμα 33: Τιμές που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης σε διάστημα ενός μήνα (όπου Η συμβολίζεται η διαφορετική ημέρα που ελέγχθηκε η ψηφίδα πυριτίου στο διάστημα αυτό) με ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί και φυλαχθεί στους 4 °C. Κάθε στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.....	161
Σχήμα 34: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) για μηδενικό πρότυπο διάλυμα (μπλε στήλες) και για πρότυπο διάλυμα που περιείχε μετά από κάθε αραιώση 0,001% (o/o) φρέσκο αγελαδινό γάλα σε κασικίσιο γάλα	

(κόκκινες στήλες) για τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 164

Σχήμα 35: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο και για πρότυπα διαλύματα φρέσκου αγελαδινού γάλακτος περιεκτικότητας 0,01, 0,05 και 0,1% που παρασκευάστηκαν σε: φρέσκο (■),εμπορικά διαθέσιμο χαμηλής παστερίωσης (●) ή σε εμπορικά διαθέσιμο υψηλής παστερίωσης κατσικίσιο γάλα (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 165

Σχήμα 36: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο καθώς και για τα πρότυπα διαλύματα φρέσκου αγελαδινού γάλακτος (■), χαμηλής παστερίωσης εμπορικά διαθέσιμου αγελαδινού γάλακτος (●) και υψηλής παστερίωσης εμπορικά διαθέσιμου αγελαδινού γάλακτος (▲), περιεκτικότητας 0,01, 0,05 και 0,1% (ο/ο) σε φρέσκο κατσικίσιο γάλα για τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 166

Σχήμα 37: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο του ανοσοεζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 167

Σχήμα 38: Καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου και πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης σε κατσικίσιο γάλα όταν: ως αντίσωμα για την επικάλυψη των φρεατίων χρησιμοποιήθηκε το 33-4G10 και ως αντίσωμα δέσμησης το 33-6A10 (■) ή αντιστρόφως (●). Σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση των αντισωμάτων ήταν 5 mg/mL. Από τις τιμές οπτικής απορρόφησης έχει αφαιρεθεί το σήμα του μηδενικού προτύπου (σήμα μη ειδικής δέσμησης). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 169

Σχήμα 39: Καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης

που είχαν παρασκευαστεί σε κασικίσιο γάλα όταν η συγκέντρωση του αντισώματος 33-6A10 στο διάλυμα ακινητοποίησης ήταν 5 µg/mL (■) και 10 µg/mL (●), αντίστοιχα. Από τις τιμές οπτικής απορρόφησης έχει αφαιρεθεί το σήμα του μηδενικού προτύπου (σήμα μη ειδικής δέσμευσης). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 170

Σχήμα 40: Καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου για πρότυπα διαλύματα κ- καζεΐνης σε κασικίσιο γάλα όταν το διάλυμα ανοσοαντίδρασης δεν περιείχε Tween 20 (■) ή περιείχε 0,05% (o/o) Tween 20 (●). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 171

Σχήμα 41: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου για πρότυπα καζεΐνης συγκέντρωσης 2 (μαύρες στήλες), 5 ng/mL (κόκκινες στήλες) και 10 ng/mL (μπλε στήλες) τα οποία είχαν παρασκευαστεί σε : i) ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης, ii) ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης που περιείχε 2% κασικίσιο γάλα, ή iii) ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης που περιείχε 10% κασικίσιο γάλα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 172

Σχήμα 42: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο και για τα πρότυπα διαλύματα περιεκτικότητας 0,001, 0,0025 και 0,005% (o/o) σε φρέσκο αγελαδινό γάλα (■),εμπορικά διαθέσιμο αγελαδινό γάλα χαμηλής παστερίωσης (●) και εμπορικά διαθέσιμο αγελαδινό υψηλής παστερίωσης (▲), σε φρέσκο κασικίσιο γάλα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 173

Σχήμα 43: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD..... 174

Σχήμα 44: Τιμές αναλυτικού σήματος (ακτίνια) που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα (ροζ στήλες) ή διάλυμα που περιείχε 0,005% (o/o) αγελαδινό γάλα σε κασικίσιο γάλα μετά την αραίωση (κίτρινες στήλες), καθώς και οι αντίστοιχες τιμές του σήματος μη ειδικής δέσμευσης (μαύρες

στήλης). Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή 7 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD για την περίπτωση του ειδικού σήματος, ενώ για την περίπτωση του μη ειδικού σήματος τη μέση τιμή 3 μετρήσεων \pm SD 177

Σχήμα 45: Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από 4 MZIs μιας ψηφίδας κατά τη διαβίβαση μιγμάτων των αντισωμάτων κατά της κ-καζεΐνης με πρότυπα διαλύματα αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα περιεκτικότητας 0, 0,1, 0,25, 0,5 και 1% (ο/ο). Επίσης παρέχονται, οι αποκρίσεις από 2 MZIs που αντιστοιχούν στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης (τυφλό)..... 178

Σχήμα 46: Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από 4 MZIs μιας ψηφίδας κατά τη διαβίβαση μιγμάτων των αντισωμάτων κατά της κ-καζεΐνης με πρότυπα διαλύματα αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα περιεκτικότητας 0, 0,1, 0,25, 0,5 και 1% (ο/ο) για 2,5 min ακολουθούμενη από διέλευση διαλύματος 2^{ου} αντισώματος για 2,5 min. Επίσης παρέχονται, οι αποκρίσεις από 2 MZIs που αντιστοιχούν στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης (τυφλό)..... 179

Σχήμα 47: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο ανοσοχημικού προσδιορισμού με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 7 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 180

Σχήμα 48: Συσχέτιση των αναμενόμενων με τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο που ελήφθησαν με διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων στα οποία η αρχική προσθήκη ήταν: 0,8% (ο/ο) (■), 0,7% (ο/ο) (●) και 0,6% (ο/ο) (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 7 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 182

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Μηχανισμός αλλεργικής απόκρισης πρώτου και δεύτερου σταδίου.....	33
Εικόνα 2: Μηχανισμός καταστροφής εντερικού βλεννογόνου κατά την κοιλιοκάκη.....	50
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της ανάλυσης μέσω PCR.....	58
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου.....	61
Εικόνα 5: Αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας των βιοαισθητήρων.....	66
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση εκτυπωμένων ηλεκτροδίων πλέγματος, αποτελούμενο από ηλεκτρόδιο αναφοράς, ηλεκτρόδιο εργασίας και βοηθητικό ηλεκτρόδιο.....	67
Εικόνα 7: Ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας με: Α) χρήση ενός ενζύμου ως ιχνηθέτη (υπεροξειδάση της ραπανάδος- HRP) και Β) καταλυτική σύνδεση με δεύτερο ένζυμο (οξειδάση της γλυκόζης- GOD).....	68
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διάταξης πιεζοηλεκτρικού αισθητήρα.....	70
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του φθίνοντος πεδίου. Η σύνδεση του αναλύτη με το ακινητοποιημένο στον κυματοδηγό βιοδραστικό μόριο έχει ως αποτέλεσμα να μεταβάλλεται ο δραστικός δείκτης διάθλασης στην επιφάνειά του ανάλογα με την ποσότητα του αναλύτη που συνδέεται με το βιοδραστικό μόριο λαμβάνει χώρα εντός του φθίνοντος πεδίου	72
Εικόνα 10: Εφαρμογές του τριχοειδούς ως οπτικού κυματοδηγού. (Α) Διέγερση και ανίχνευση μέσω του φθίνοντος κύματος, (Β) διέγερση μέσω του φθίνοντος κύματος και απευθείας ανίχνευση κάθετα ως προς το επίπεδο διέγερσης και (Γ) διέγερση κάθετα ως προς τον άξονα του τριχοειδούς και ανίχνευση μέσω του φθίνοντος κύματος	74
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση διάταξης μικροδακτυλιοειδών ταλαντωτών.....	76
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση αισθητήρα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων όπου η ανίχνευση πραγματοποιείται βάσει της γωνίας πρόσπτωσης για τη διέγερση των πλασμονίων	77
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού συμβολομέτρου Mach-Zehnder (αριστερά) και ενός Young (δεξιά).....	82
Εικόνα 14: Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός μονολιθικά ολοκληρωμένου σε	

ψηφίδα πυριτίου συμβολομέτρου Mach-Zehnder.....	84
Εικόνα 15: Αντίδραση βιοτινυλίωσης πρωτεΐνης.....	90
Εικόνα 16: Ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) αλλεργιογόνου πρωτεΐνης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης.....	93
Εικόνα 17: Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης ELISA, Victor ³ Multilabel Readers (PerkinElmer, ΗΠΑ).....	94
Εικόνα 18: Μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικός προσδιορισμός αλλεργιογόνου πρωτεΐνης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης.....	96
Εικόνα 19: Υδροφιλοποίηση και χημική τροποποίηση- σιλανοποίηση ψηφίδων πυριτίου με APTES	97
Εικόνα 20: Α) Ακίνητοποίηση μίας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης και Β) ακίνητοποίηση τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε ψηφίδα πυριτίου.....	99
Εικόνα 21: Συσκευή αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher TM MiniArrayer της Bio-Rad.....	100
Εικόνα 22: Α) Ψηφίδα πυριτίου με ενσωματωμένη μικρορευστομηχανική κυψελίδα πάνω σε ειδική βάση και Β) Πειραματική διάταξη ανίχνευσης βιομοριών σε πραγματικό χρόνο χωρίς τη χρήση ιχνηθετών.....	102
Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση της ανοσοαντίδρασης: εισαγωγή μίγματος προτύπων διαλυμάτων- αντισωμάτων και στη συνέχεια διέλευση δευτέρου αντισώματος πάνω από την επιφάνεια της ψηφίδας πυριτίου. Αναγέννηση της επιφάνειας μετά την ολοκλήρωση κάθε κύκλου ανοσοαντίδρασης	104
Εικόνα 24: Τυπικό φάσμα συμβολής ενός MZI πριν την ανοσοαντίδραση (μπλε γραμμή) και μετατόπιση του φάσματος μετά την ανοσοαντίδραση (κόκκινη γραμμή).....	105
Εικόνα 25: TOF-SIMS ανάλυση ψηφίδων οξειδίου του πυριτίου επιστρωμένων με Si ₃ N ₄ στα οποία έχει ακίνητοποιηθεί διάλυμα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 5, 10, 20, 50, 100 και 200 μg/mL.....	134
Εικόνα 26: : Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης με TOF-SIMS της περιοχής γύρω από τον αισθητήριο βραχίονα ενός MZI: 1) προ χημικής τροποποίησης, 2) κατόπιν χημικής τροποποίησης με APTES, και 3) κατόπιν ακίνητοποίησης κ-καζεΐνης από διάλυμα συγκέντρωσης 100 μg/mL.....	135
Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση μικρορευστομηχανικών κυψελίδων με διαμόρφωση τύπου (Α), (Β) και (Γ), αντίστοιχα, και η σχετική τους θέση ως προς την ψηφίδα.....	143

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις ακινητοποιημένης πρωτεΐνης, αντισωμάτων ανοσοαντίδρασης και δευτέρων αντισωμάτων.....	94
Πίνακας 2: Συνθήκες εναπόθεσης μικροκηλίδων με χρήση συμπαγούς ακίδας.....	101
Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις προτύπων αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, αντισωμάτων ανοσοαντίδρασης και δευτέρων αντισωμάτων.....	105
Πίνακας 4: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των ανοσοενζυμικών προσδιορισμών των πέντε αλλεργιογόνων πρωτεϊνών.....	131
Πίνακας 5: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ταυτόχρονου ανοσοχημικού προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.....	152
Πίνακας 6: Επί τοις εκατό ανάκτηση εξωγενώς προστεθείσας καζεΐνης σε δείγμα νερού δικτύου και δείγματα από εκπλυστικές μηχανές.....	153
Πίνακας 7: Επί τοις εκατό ανάκτηση εξωγενώς προστεθείσας πρωτεΐνης φιστικιού σε δείγμα νερού δικτύου και δείγματα από εκπλυστικές μηχανές.....	154
Πίνακας 8: Επί τοις εκατό ανάκτηση εξωγενώς προστεθείσας πρωτεΐνης σόγιας σε δείγμα νερού δικτύου και δείγματα από εκπλυστικές μηχανές.....	154
Πίνακας 9: Επί τοις εκατό ανάκτηση εξωγενώς προστεθείσας γλιαδίνης σε δείγμα νερού δικτύου και δείγματα από εκπλυστικές μηχανές.....	155
Πίνακας 10: Κλίσεις (α), τεταγμένες επί την αρχή (β), και συντελεστές συσχέτισης των ευθειών παλινδρόμησης που προέκυψαν από το πείραμα γραμμικότητας αραίωσης για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες.....	156
Πίνακας 11: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις καζεΐνης και γλιαδίνης σε δείγματα που αναλύθηκαν με τους αντίστοιχους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς ανταγωνιστικού τύπου (ELISA) και τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.....	158
Πίνακας 12: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης φιστικιού και πρωτεΐνης σόγιας σε δείγματα που αναλύθηκαν με τους αντίστοιχους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς ανταγωνιστικού τύπου (ELISA) και τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.....	159
Πίνακας 13: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο.....	167
Πίνακας 14: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου του βοείου γάλακτος σε κασικίσιο.....	175
Πίνακας 15: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοχημικού προσδιορισμού	

βοείου γάλακτος σε κατσικίσιο με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.....	181
Πίνακας 16: Επί τοις εκατό ανάκτηση για το αγελαδινό γάλα μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων σε φρέσκο κατσικίσιο γάλα.....	182
Πίνακας 17: % Περιεκτικότητα αγελαδινού γάλακτος σε δείγματα πρόβειου γάλακτος με τον ανταγωνιστικού τύπου ανασοενζυμικό προσδιορισμό σε φρεάτια μικροπιλοδότησης και με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.....	183
Πίνακας 18: Μέθοδοι για την ανίχνευση των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με αισθητήρες.....	193

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΤΡΟΦΙΚΗ ΑΛΛΕΡΓΙΑ

1.1 Εισαγωγή

Τα τρόφιμα είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την ομαλή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού καθώς παρέχουν βασικά συστατικά όπως οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι βιταμίνες. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη διατροφή ενός οργανισμού δεδομένου ότι δεν μπορεί να συνθέσει όλα τα αμινοξέα και πρέπει να τα λάβει με τα τρόφιμα. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες των τροφίμων μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις/υπερευαισθησίες προερχόμενες από το ανοσοποιητικό σύστημα όπως είναι η αλλεργία, ή αντιδράσεις/υπερευαισθησίες οι οποίες δεν σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και προκαλούνται από μεταβολικούς, τοξικούς, φαρμακολογικούς και αδιευκρίνιστους μηχανισμούς όπως είναι η δυσανεξία.

1.2 Τροφική αλλεργία

1.2.1 Ορισμός και κατηγορίες αλλεργικής απόκρισης σε τρόφιμα

Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Αλλεργίας και Μεταδοτικών Ασθενειών των Η.Π.Α. ως τροφική αλλεργία ορίζεται μία αρνητική επίπτωση στην υγεία, που προκαλείται από ειδική ανοσολογική απόκριση η οποία παρουσιάζεται κατ' επανάληψη μετά από έκθεση σε συγκεκριμένη τροφή [1]. Στην περίπτωση αυτή, το ανοσοποιητικό σύστημα διεγείρεται από ουσίες, οι οποίες καλούνται αλλεργιογόνα και γενικά δεν είναι επιβλαβείς, όπως οι πρωτεΐνες των τροφών ή μη αμινοξικά τμήματα των πρωτεϊνών όπως οι υδατάνθρακες [2]. Η τροφική αλλεργία εμφανίζεται συχνότερα κατά την παιδική ηλικία σε σχέση με την ενήλικη ζωή και συγκεκριμένα επηρεάζει 3-8% του παιδικού πληθυσμού και 1-3% των ενηλίκων [3]. Η συχνότητα εμφάνισης και η βαρύτητα των συμπτωμάτων παρουσιάζει αύξηση και σχετίζεται εκτός από γενετικούς παράγοντες με περιβαλλοντικούς και πολιτισμικούς παράγοντες καθώς και με τον τρόπο ζωής.

Η τροφική αλλεργία διακρίνεται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος: την άμεσου τύπου αλλεργική απόκριση και την απώτερου τύπου αλλεργική απόκριση, η οποία συνήθως εμφανίζεται 24-48 ώρες μετά την επαφή με το αλλεργιογόνο.

1.2.2 Άμεσου τύπου αλλεργική απόκριση

Η άμεσου τύπου αλλεργική απόκριση περιλαμβάνει πέντε βήματα: την αντιγονοπαρουσίαση, την παραγωγή IgE, την ενεργοποίηση των μαστικών κυττάρων, την απελευθέρωση ρυθμιστικών παραγόντων και την εμφάνιση συμπτωμάτων. Πραγματοποιείται σε δύο στάδια: την αρχική έκθεση σε αλλεργιογόνο και την απώτερη έκθεση στο ίδιο αλλεργιογόνο.

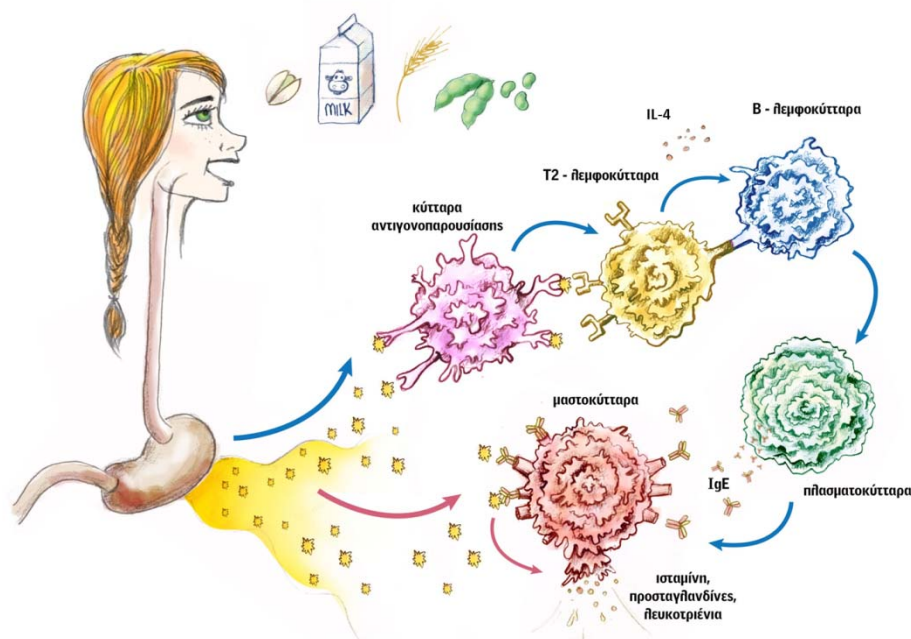
Πρώτο στάδιο αλλεργικής απόκρισης:

Μετά την πρόσληψη τροφίμου που περιέχει αλλεργιογόνο, το τελευταίο διαπερνά τη μεμβράνη του εντερικού βλεννογόνου μέσω των Μ-κυττάρων, τα οποία μεταφέρουν το αλλεργιογόνο στα κύτταρα αντιγονοπαρουσίασης. Τα κύτταρα αυτά (μακροφάγα, δενδριτικά ή Β-λεμφοκύτταρα) προσλαμβάνουν το αλλεργιογόνο στο εσωτερικό τους μέσω μηχανισμών ενδοκύτωσης ή φαγοκύτωσης και στη συνέχεια το αποικοδομούν σε ολιγοπεπτίδια, τα οποία συνδέονται με το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τύπου II (MHC II). Τα συμπλέγματα αυτά μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη, όπου τα πεπτίδια παρουσιάζονται στα CD4+ T2-βοηθητικά κύτταρα (Th-2). Το στάδιο αυτό ονομάζεται αντιγονοπαρουσίαση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των συμπλεγμάτων MHCII-πεπτιδίων με τους υποδοχείς των T-κυττάρων στην επιφάνεια των Th-2 κυττάρων ενεργοποιεί τα T-βοηθητικά κύτταρα και διεγείρει την παραγωγή λεμφοκινών όπως η ιντερλευκίνη 4 (IL-4), η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τα Β-κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα πλέον κύτταρα ξεκινούν να πολλαπλασιάζονται, να διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και να παράγουν IgE. Τα νεοσυντιθέμενα IgE αντισώματα εκκρίνονται στην κυκλοφορία του αίματος και συνδέονται σε υποδοχείς των μαστικών κυττάρων ή των βασεόφιλων [4,5].

Δεύτερο στάδιο αλλεργικής απόκρισης:

Όταν ένας οργανισμός ο οποίος έχει ήδη εκτεθεί σε ένα αλλεργιογόνο, επανεκτίθεται στο ίδιο, το αλλεργιογόνο δεσμεύεται στις IgE που έχουν ήδη συνδεθεί στην επιφάνεια των μαστοκυττάρων (πρώτο στάδιο). Καθώς τα αλλεργιογόνα διαθέτουν περισσότερους από έναν επίτοπο, μπορούν να συνδεθούν με πολλά διαφορετικά αντισώματα IgE (διασταυρούμενα IgE αντισώματα), πυροδοτώντας έτσι την αποικοδόμηση των μαστικών κυττάρων. Αυτό το στάδιο καλείται ενεργοποίηση των μαστικών κυττάρων. Κατά την αποικοδόμηση απελευθερώνονται ρυθμιστικοί παράγοντες με αποτέλεσμα την εμφάνιση αλλεργικών συμπτωμάτων [6]. Οι ρυθμιστικοί παράγοντες που

εκκρίνονται διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει παράγοντες όπως η ισταμίνη, η οποία σχηματίζεται μέσω αποκαρβοξυλίωσης της ιστιδίνης και μπορεί να προκαλέσει συστολή λείων μυών ή αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει νεοσυντιθέμενους ρυθμιστικούς παράγοντες όπως προσταγλανδίνες και λευκοτριένια και τα οποία ασκούν χημειοτακτική δράση στα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα, τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα. Τα λευκοτριένια μπορούν να προκαλέσουν παρατεταμένη σύσπαση των λείων μυών, ενώ οι προσταγλανδίνες μπορούν να προκαλέσουν βρογχόσπασμο [7]. (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Μηχανισμός αλλεργικής απόκρισης πρώτου και δεύτερου σταδίου.

1.2.3 Συμπτώματα αλλεργικής απόκρισης

Τα αλλεργιογόνα περνούν στην κυκλοφορία του αίματος μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα και για αυτό τα συμπτώματα μπορούν να προκληθούν άμεσα στις περιοχές επαφής με το αλλεργιογόνο (στόμα, οισοφάγος, έντερο κ.α.). Συστηματικές αντιδράσεις προκαλούνται όταν αλλεργιογόνα συνδεδεμένα με τις IgE περνούν το φραγμό του βλεννογόνου και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος.

Μία αλλεργική αντίδραση παρουσιάζεται με ποικιλία συμπτωμάτων τα οποία μπορεί να επηρεάσουν ένα ή περισσότερα οργανικά συστήματα ή ακόμα και να καταλήξουν σε μία γενική συστηματική αντίδραση. Τα όργανα τα οποία επηρεάζονται περιλαμβάνουν το γαστρεντερικό σωλήνα, την επιδερμική στοιβάδα,

το καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα. Τα συμπτώματα κυμαίνονται ανάλογα με τον οργανισμό από ήπια, όπως ναυτία, έμετο, διάρροια, εξανθήματα, κνησμό, δυσκολία στην αναπνοή έως και σοβαρά όπως το αναφυλακτικό σοκ, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο [8].

Το είδος και η βαρύτητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από την ποσότητα του αλλεργιογόνου, από τη σταθερότητά του κατά την πέψη καθώς επίσης και από τη διαπερατότητα του επιθηλιακού φραγμού [3]. Η ποσότητα του αλλεργιογόνου, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει μία αλλεργική αντίδραση σχετίζεται με πολλούς παράγοντες όπως η ανοσολογική απόκριση του κάθε ανθρώπου, η ώρα της ημέρας, οι προϋπάρχουσες φλεγμονές και οι καταστάσεις άγχους [9]. Οι άνθρωποι που πάσχουν από αλλεργία παρουσιάζουν διαβάθμιση στην ευαισθησία ως προς την κατανάλωση αλλεργιογόνων για το λόγο αυτό οι ελάχιστες επιτρεπτές δόσεις δεν είναι καθορισμένες. Ωστόσο, μερικές μελέτες προτείνουν ότι ποσότητες αλλεργιογόνων ≤ 1 mg μπορούν να προκαλέσουν μία μη φυσιολογική ανοσολογική απόκριση [10,11].

1.2.4 Πρόληψη και αντιμετώπιση της τροφικής αλλεργίας

Μέχρι σήμερα ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης της αλλεργίας είναι η πλήρης αποφυγή πρόσληψης αλλεργιογόνων τροφίμων ή προϊόντων αυτών. Ωστόσο σε περίπτωση τυχαίας έκθεσης σε αλλεργιογόνο τρόφιμο και πιο συγκεκριμένα για την ήπια αλλεργική αντίδραση προτείνεται η χορήγηση αντιισταμινικών ή/ και κορτικοστεροειδών προκειμένου να εξομαλυνθούν τα συμπτώματα [1,12]. Παρά ταύτα, τα φαρμακευτικά αυτά προϊόντα δεν είναι κατάλληλα για να εξαλείψουν μία σοβαρή αλλεργική αντίδραση. Στην περίπτωση αυτή η πρώτη γραμμή αντιμετώπισης είναι η χρήση βρογχολυτικών και/ ή επινεφρίνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

2.1 Ιδιότητες και κατηγορίες αλλεργιογόνων τροφίμων

Τα αλλεργιογόνα είναι αντιγόνα που έχουν την ικανότητα να ξεκινήσουν μία αλλεργική απόκριση σε ένα ευαισθητοποιημένο/αλλεργικό οργανισμό. Τα αλλεργιογόνα που εμπεριέχονται στα τρόφιμα είναι ως επί το πλείστον πρωτεΐνες (κυρίως γλυκοπρωτεΐνες) και εμφανίζουν υψηλή ανθεκτικότητα κατά την πέψη. Γενικά, οι αλλεργιογόνες πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από μικρό μοριακό βάρος (<70 kDa) και ισοηλεκτρικό σημείο στην όξινη περιοχή. Συνήθως, είναι ανθεκτικές σε πρωτεάσες, στη θέρμανση και στη μετουσίωση και για το λόγο αυτό διατηρούν σε πολλές περιπτώσεις την ακεραιότητά τους κατά τη διάρκεια της θερμικής κατεργασίας ή/και της πέψης [13]. Οι αλλεργιογόνες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από τις IgE και με αυτό τον τρόπο ξεκινάει ο μηχανισμός ευαισθητοποίησης και αλλεργικής απόκρισης όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Ανάλογα με τον τρόπο που ξεκινάει η ευαισθητοποίηση, τα αλλεργιογόνα αυτά κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες: την I και τη II [14]. Τα αλλεργιογόνα της κατηγορίας I περιλαμβάνουν όλες τις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες που προάγουν αλλεργική απόκριση μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα, η οποία χαρακτηρίζεται ως άμεση αλλεργική απόκριση. Τα περισσότερα από αυτά τα αλλεργιογόνα είναι ανθεκτικά στη θέρμανση καθώς και στην πρωτεολυτική πέψη, γεγονός που τα καθιστά ικανά για την πρόκληση σοβαρών και συστημικών αντιδράσεων [15]. Τα αλλεργιογόνα της κατηγορίας II, είναι πρωτεΐνες (όπως η Mal d 1 του μήλου) υψηλής ομολογίας με πρωτεΐνες που βρίσκονται στη γύρη (major birch pollen allergen, bet v 1). Οι πρωτεΐνες της γύρης προκαλούν ευαισθητοποίηση μέσω του αναπνευστικού συστήματος και στη συνέχεια αντιδρούν διασταυρούμενα με τις ομόλογές τους προκαλώντας αλλεργική αντίδραση. Η θερμική κατεργασία μειώνει την αλλεργιογόνο δράση των ομόλογων στη γύρη πρωτεϊνών, καταστρέφοντας τη διαμόρφωση των αλλεργιογόνων επιτόπων τους [15]. Οι αλλεργιογόνες πρωτεΐνες της κατηγορίας II συνήθως αποικοδομούνται εύκολα και είναι υπεύθυνες για την πρόκληση ήπιων συμπτωμάτων τα οποία περιορίζονται στη στοματική κοιλότητα [16]. Επιπλέον, η αλλεργιογόνος δράση αυτών των ουσιών καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη θέση των διαφορετικών επιτόπων στο μόριο τους. Στην περίπτωση των αλλεργιογόνων της κατηγορίας I οι επίτοποι είναι διαδοχικοί, ενώ της κατηγορίας II μη διαδοχικοί [17].

Τα αλλεργιογόνα των τροφίμων ταξινομούνται σε ζωικής και φυτικής προέλευσης. Οι προερχόμενες από ζώα αλλεργιογόνες πρωτεΐνες στην πλειοψηφία τους θεωρούνται πρωτεΐνες μεταφοράς (καζεΐνες, αλβουμίνες, σφαιρίνες) ή ρυθμιστικές/δομικές πρωτεΐνες (τροπομοουσίνες, παρβαλβουμίνες). Οι προερχόμενες από τα φυτά πρωτεΐνες είναι κυρίως αποθηκευτικές πρωτεΐνες (βικιλίνες, αλβουμίνες, λεγκουμίνες). Παρ' όλα αυτά, ορισμένα αλλεργιογόνα εκτελούν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες, όπως λειτουργίες μεταφοράς (πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων), δομικές λειτουργίες (προφιλίνες) και αμυντικές λειτουργίες (πρωτεΐνες σχετικές με παθογόνα).

Φαινομενικά κάθε τρόφιμο μπορεί να είναι ικανό να πυροδοτήσει μία αλλεργική αντίδραση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν βρεθεί πάνω από εκατόν εξήντα τρόφιμα που προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις. Περίπου το 90% των μη φυσιολογικών ανοσολογικών αποκρίσεων οφείλεται σε συγκεκριμένες κατηγορίες τροφίμων [18]. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή αναφέρονται δεκατέσσερις κατηγορίες δυνητικά αλλεργιογόνων τροφίμων, οι οποίες περιλαμβάνουν το αυγό, το γάλα, τα ψάρια, τα μαλάκια, τη σόγια, τα δημητριακά, λόγω τη περιεκτικότητάς τους σε γλουτένη, το φιστίκι και τους υπόλοιπους ξηρούς καρπούς, το σουσάμι, τη μουστάρδα, το σέλερι, το λούπινο και τρόφιμα που περιέχουν θειώδη [19,20]. Η λίστα των αλλεργιογόνων τροφίμων που παρέχεται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή είναι η πληρέστερη, ωστόσο και άλλες χώρες διαθέτουν αντίστοιχες λίστες, όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες (οχτώ αλλεργιογόνα), ο Καναδάς (δώδεκα αλλεργιογόνα), η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία (δέκα αλλεργιογόνα) και η Ιαπωνία (έξι αλλεργιογόνα), προκειμένου να προστατεύσουν τους ανθρώπους που πάσχουν από αλλεργίες.

Τροφικές αλλεργίες οι οποίες οφείλονται στο γάλα, στο αυγό, στη σόγια και στη γλουτένη είναι συνήθως παροδικές. Αντίθετα τροφικές αλλεργίες που οφείλονται στο φιστίκι, στους ξηρούς καρπούς και στο ψάρι συνήθως παραμένουν εφ' όρου ζωής [21]. Με την πάροδο του χρόνου μπορεί να αναπτυχθεί φυσική ανοχή σε ορισμένα αλλεργιογόνα. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο αλλεργίες όπως π.χ. στο γάλα ή στο αυγό, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη συχνότητα εμφάνισης σε παιδιά μικρής ηλικίας, εξαλείφονται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας ή της εφηβείας. Σε αντίθεση, αλλεργίες όπως στο φιστίκι μπορούν να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια της εφηβείας και είναι υπεύθυνες για την πρόκληση των συστηματικών αλλεργικών αντιδράσεων (οι οποίες δυνητικά μπορούν να οδηγήσουν και σε θάνατο).

Στη συνέχεια θα αναπτυχθούν διεξοδικότερα τα σχετικά με τη φύση, την πρωτεϊνική σύσταση και τις αλλεργικές αποκρίσεις που προκαλούνται από το αγελαδινό γάλα, το φιστίκι, τη σόγια και τα σιτηρά (γλουτένη), των οποίων η ανίχνευση αποτελεί στόχο της παρούσας διατριβής.

2.2 Αγελαδινό Γάλα

Το αγελαδινό γάλα είναι η επικρατέστερη μορφή γάλακτος που παράγεται και καταναλώνεται παγκοσμίως. Είναι υψηλής θρεπτικής αξίας τροφή και περιέχει ευεργετικά για την υγεία συστατικά. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται τόσο αυτούσιο όσο και ως προϊόν διαφόρων τροφίμων συμπεριλαμβανομένων των τυριών, της γιαούρτης και των παγωτών.

Οι πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος είναι γνωστές για τις λειτουργικές ιδιότητές τους ως συστατικά ή συμπληρώματα διατροφής, ωστόσο είναι υπεύθυνες για την πρόκληση αλλεργιών [22].

2.2.1 Σύσταση αγελαδινού γάλακτος

Το κύριο συστατικό του γάλακτος είναι το νερό και αποτελεί το 85% του τελικού προϊόντος. Τα στερεά συστατικά του γάλακτος περιλαμβάνουν θεμελιώδεις διατροφικούς παράγοντες, όπως υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες και ανόργανα άλατα. Το αγελαδινό γάλα περιέχει πάνω από είκοσι πρωτεΐνες σε ποσοστό 3-3,5%, οι οποίες βάσει της διαλυτότητας τους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις καζεΐνες και τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος (whey proteins). Οι πρωτεΐνες του γάλακτος είναι ανθεκτικές στη θέρμανση [23]. Οι καζεΐνες αποτελούν το 80% της συνολικής πρωτεΐνης, ενώ οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος διακρίνονται σε κύριες και δευτερεύουσες και αποτελούν το εναπομένον 20% [24,25]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι κυριότερες αλλεργιογόνες πρωτεΐνες είναι οι καζεΐνες, η β-λακτοσφαιρίνη και η α-λακταλβουμίνη (κύριες γαλακταλβουμίνες). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες σε μικρότερο ποσοστό όπως είναι η οραλβουμίνη βοός (BSA), η λακτοφερίνη και ανοσοσφαιρίνες γ (IgG) (δευτερεύουσες πρωτεΐνες ορού γάλακτος), με χαμηλότερη αλλεργιογόνο δράση.

2.2.2 Καζεΐνες

Οι καζεΐνες είναι η κύρια οικογένεια πρωτεϊνών του γάλακτος σε ποσοστό 80% της συνολικής πρωτεΐνης. Η ολική καζεΐνη βρίσκεται σε διάλυμα ως μία καθορισμένη

δομή των εξής πρωτεϊνών: την αs1-, την αs2-, τη β-, τη γ- και την κ-καζεΐνη [22,25]. Κάθε πρωτεΐνη ξεχωριστά αντιπροσωπεύει μία διακριτή χημική ένωση, η οποία κωδικοποιείται από διαφορετικά γονίδια που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα [25]. Οι αs1-καζεΐνες αντιπροσωπεύουν πάνω από το 40% της ολικής καζεΐνης στο αγελαδινό γάλα [26]. Οι αs2-καζεΐνες βρίσκονται σε ποσοστό 12,5% της ολικής καζεΐνης και είναι οι πλέον υδρόφιλες μεταξύ των καζεϊνών, λόγω της ύπαρξης ανιονικών ομάδων. Η β-καζεΐνη αποτελεί το 35% της ολικής καζεΐνης, είναι η πλέον υδρόφοβη και παρουσιάζει ιδιαίτερη πολυπλοκότητα λόγω μίας ενδογενούς πρωτεάσης, της πλασμίνης. Η πρωτεάση αυτή διασπά τη β-καζεΐνη δημιουργώντας τις γ1-, γ2- γ3- καζεΐνες. Η κ-καζεΐνη αποτελεί το μικρότερο ποσοστό της ολικής καζεΐνης (12%) αλλά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα και στην πήξη του γάλακτος.

Οι καζεΐνες μπορούν να χαρακτηριστούν περαιτέρω ως ευαίσθητες ή μη ευαίσθητες στο ασβέστιο. Οι ευαίσθητες στο ασβέστιο καζεΐνες περιλαμβάνουν την αs1-, την αs2- και τη β-καζεΐνη, ενώ η κ-καζεΐνη ανήκει στις μη ευαίσθητες στο ασβέστιο καζεΐνες [25]. Οι ευαίσθητες στο ασβέστιο καζεΐνες είναι ανιονικές λόγω της φωσφορυλίωσης των καταλοίπων της σερίνης, καθιστώντας τις ικανές να σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με το ασβέστιο [22,24]. Στο γάλα υπάρχουν 30 mM ασβεστίου, γι' αυτό θα μπορούσε να συμβεί γρήγορη πήξη λόγω της αντίδρασης των αρνητικά φορτισμένων καζεϊνών με τα θετικά φορτισμένα ιόντα ασβεστίου που βρίσκονται στο διάλυμα. Η αντίδραση αυτή αποφεύγεται μέσω του σχηματισμού μικκυλίων που δημιουργούν οι καζεΐνες στο διάλυμα, μετά από διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ τους [23]. Οι καζεΐνες μαζί με τα λιποσφαίρια είναι υπεύθυνες για το λευκό χρώμα του γάλακτος, λόγω της ανάκλασης του φωτός στα μικκύλια του καζεϊνικού ασβεστίου (ο ορός του γάλακτος, που δεν περιέχει καζεΐνες, έχει υπόλευκο έως υποκίτρινο χρώμα).

Τα μικκύλια είναι κολλοειδείς δομές, που εσωτερικά είναι υδρόφοβα (υπομικκύλια) και εξωτερικά είναι υδρόφιλα. Η δημιουργία των μικκυλίων επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ υδρόφοβων περιοχών των καζεϊνών σχηματίζοντας έναν υδρόφοβο πυρήνα [22,27]. Μέσα στο εσωτερικό των μικκυλίων παρατηρείται ηλεκτροστατική απώθηση λόγω της ύπαρξης φωσφοσερινών. Αυτή η απώθηση ελαττώνεται με την πρόσδεση ασβεστίου στο εσωτερικό των μικκυλίων, καθώς σχηματίζονται μόρια φωσφορικού ασβεστίου [22]. Με την πρόσδεση του ασβεστίου αντισταθμίζονται τα ανιονικά φορτία προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο σταθεροποίηση των μικκυλίων. Η μη ευαίσθητη στο ασβέστιο κ-καζεΐνη παρέχει περαιτέρω σταθεροποίηση περικυκλώνοντας το υδρόφοβο υπομικκύλιο και

σχηματίζοντας μια «τριχωτή στιβάδα». Το καρβοξυτελικό άκρο της κ-καζεΐνης είναι υδρόφιλο και προεξέχει από το μικκύλιο. Επομένως, η σταθεροποίηση του μικκυλίου της καζεΐνης εξαρτάται από την παρουσία της κ-καζεΐνης, η οποία βρίσκεται στη επιφάνεια του μικκυλίου και λειτουργεί ως μεσόφαση μεταξύ των ευαίσθητων στο ασβέστιο καζεϊνών και του υδατικού περιβάλλοντος.

Η κ-καζεΐνη απομονώθηκε από το γάλα ως μείγμα πολυμερών (διμερή ως οκταμερή) συνδεδεμένα με δισουλφιδικούς δεσμούς. Έχει προταθεί ότι μόρια κ-καζεΐνης συνδέονται μεταξύ τους μέσω δισουλφιδικών δεσμών σχηματίζοντας πολυμερή με τέτοια δομή ώστε τα υδρόφιλα καρβοξυ-τελικά άκρα της να εκτείνονται προς τον ορό του γάλακτος, ενώ η υδρόφοβη περιοχή να προσκολλάται στο πυρήνα του μικκυλίου. Επιπρόσθετα, πέραν της φυσικής λειτουργίας της ως γαλακτωματοποιητής, η κ-καζεΐνη υδρολύεται μέσω της χυμοσίνης κατά τη διάρκεια παραγωγής τυριού. Η χυμοσίνη διασπά πολύ ειδικά την κ-καζεΐνη στο δεσμό μεταξύ της φαινυλαλανίνης 105 και της μεθειονίνης 106, παράγοντας πάρα-κ-καζεΐνη (κατάλοιπα 1 έως 105) και ένα μακροπεπτίδιο που ονομάζεται καζεΐνομακροπεπτίδιο ή γλυκομακροπεπτίδιο (κατάλοιπα 106 έως 169). Η πάρα-κ-καζεΐνη είναι αδιάλυτη και παραμένει στη επιφάνεια των μικκυλίων, προκαλώντας τη συσσωμάτωσή τους και τη δημιουργία πηκτώματος. Το διαλυτό μέρος του καζεΐνομακροπεπτιδίου (GMP) της κ-καζεΐνης παραμένει στον ορό του γάλακτος και κατ' επέκταση και του τυριού και υφίσταται περαιτέρω ενζυμική αποικοδόμηση [27]. Το GMP είναι ένα βιοενεργό πεπτίδιο του ορού του γάλακτος, το οποίο περιέχει όλους τους υδατάνθρακες της κ-καζεΐνης και εμφανίζει αντιμικροβιακή, ανοσορυθμιστική και προβιοτική δράση [27,28]. Παρ' όλο που το GMP απελευθερώνεται από την κ-καζεΐνη κατά τη διαδικασία παραγωγής τυριού, μικρότερες συγκεντρώσεις αυτού υπάρχουν και στο αγελαδινό γάλα (δέκα φορές χαμηλότερη συγκέντρωση) [29].

2.2.3 Γάλα από διαφορετικά είδη θηλαστικών και νοθεία

Το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντικά συστατικά της διατροφής ενός οργανισμού και προέρχονται από αγελαδινό, κατσικίσιο και πρόβειο γάλα. Το πρόβειο γάλα εμφανίζει την υψηλότερη συγκέντρωση σε πρωτεΐνες (65,92 mg/mL), ακολουθεί το κατσικίσιο (46,9 mg/mL) και τέλος το αγελαδινό (40,03 mg/mL). Το κατσικίσιο γάλα περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό λίπους σε σχέση με το αγελαδινό και πιο συγκεκριμένα εμπεριέχει υψηλότερο ποσοστό απαραίτητων

λιπαρών οξέων, κυρίως μεσαίας και μικρής αλυσίδας σε σχέση με το αγελαδινό γάλα. Επιπλέον, κατά την είσοδο του στο στομάχι το κασικίσιο γάλα σχηματίζει ένα λιγότερο πυκνό τυρόπηγμα το οποίο σε συνδυασμό με τη διαφορετική φυσικοχημική σύσταση του γάλακτος αυτού μπορεί να είναι πιο εύπεπτο σε σχέση με το αγελαδινό, κυρίως από τα νεογνά [24].

Η κατανάλωση κασικίσιου ή πρόβειου γάλακτος αποτελεί μία εναλλακτική πηγή πρωτεϊνών σε ανθρώπους που εμφανίζουν υπερευαισθησία στο αγελαδινό γάλα [30]. Το κασικίσιο γάλα περιλαμβάνει πολύ μικρές ποσότητες της $as1$ -καζεΐνης, που είναι και η πιο αλλεργιογόνος. Σύμφωνα με μελέτες το κασικίσιο γάλα χρησιμοποιείται συχνά ως υποκατάστατο του αγελαδινού γάλακτος, πιο συγκεκριμένα ως συστατικό της διατροφής παιδιών με ατοπική δερματίτιδα, τα οποία εμφανίζουν υψηλή ανεκτικότητα στο συγκεκριμένο είδος γάλακτος [24].

Τα προϊόντα των γαλακτοβιομηχανιών περιλαμβάνουν εμφιαλωμένο γάλα, βούτυρο, τυρί και γιαούρτι. Το γάλα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή αυτών των προϊόντων μπορεί να παραληφθεί τόσο από αγελαδινό γάλα, όσο και γάλα κατσίκας, προβάτου και βουβαλιού. Η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία έχει θεσπίσει κατευθυντήριες οδηγίες (Directive 2000/13/EC και 2003/89/EC) [31,32] και υποχρεώνει τις βιομηχανίες τροφίμων να επισημαίνουν το είδος προέλευσης του γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τυριού ή άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων [33]. Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα για τους καταναλωτές είναι η νοθεία του γάλακτος που προέρχεται από άλλα είδη πέραν το αγελαδινού, με αγελαδινό γάλα ή με ορό τυριού το οποίο είναι ένα φτηνό παραπροϊόν (πέντε φορές φτηνότερο από το αγελαδινό γάλα) και παραλαμβάνεται κατά την παραγωγή τυριού από αγελαδινό γάλα. Η νοθεία γίνεται προκειμένου να μειωθεί το κόστος παραγωγής και να αυξηθούν τα περιθώρια κέρδους τόσο για τους παραγωγούς όσο και για τις γαλακτοβιομηχανίες [34]. Η ανίχνευση της νοθείας είναι σημαντική, καθώς ορισμένο ποσοστό καταναλωτών παρουσιάζει δυσανεξία ή αλλεργία σε κάποιο συγκεκριμένο είδος γάλακτος, όπως και ένα ποσοστό καταναλωτών πρέπει να αποφεύγει κάποιο συγκεκριμένο είδος γάλακτος για ηθικούς, πολιτισμικούς ή θρησκευτικούς λόγους [35].

Η κατανάλωση του κασικίσιου γάλακτος αυξάνεται παγκοσμίως, λόγω της ευκολίας στην πέψη, της ιδιαίτερης γεύσης και της υψηλότερης διατροφικής αξίας, που το καθιστούν πιο ακριβό σε σχέση με το αγελαδινό. Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με την εποχιακή διαθεσιμότητα και την πιο

περιορισμένη παραγωγή του ανάλογα με τη γεωγραφική θέση το καθιστούν ελκυστικό για νοθεία.

2.3 Φιστίκι

Η φιστικιά ή αλλιώς αραχίδα (*Arachis hypogea*) είναι ποώδης μονοετής ή διετής φυτό που αναπτύσσεται κάτω από το έδαφος, με αντιπροσωπευτικότερο είδος την υπόγειο αραχίδα ή αράπικο φιστίκι. Ανήκει στην οικογένεια των Κυαμοειδών (*Fabaceae*) ή Χεδροπών (*Leguminosae*), η οποία επίσης περιλαμβάνει τα μπιζέλια, τις φακές και τα φασόλια [36]. Η καλλιέργεια του φιστικιού ξεκίνησε από τη Νότιο Αμερική πριν από περίπου 5000 χρόνια και καλλιεργείται κυρίως σε τροπικό και υποτροπικό κλίμα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες οι πιο διαδομένες ποικιλίες φιστικιού είναι οι: Virginia, Spanish, Valencia και Runner. Μεταξύ αυτών οι κυρίαρχες ποικιλίες είναι οι Runner και Virginia με ποσοστά 79% και 20%, αντίστοιχα. Η ποικιλία Runner χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή του φιστικοβούτυρου, ενώ η Virginia χρησιμοποιείται σε συσκευασμένα σνακς, σε επιδόρπια, γλυκά και εν γένει σε διάφορα θερμικώς κατεργασμένα τρόφιμα [37]. Επίσης, το αλεύρι που προέρχεται από φιστίκι χρησιμοποιείται συχνά για να προσδώσει γεύση και άρωμα και να αυξήσει το ποσοστό της πρωτεΐνης σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων.

Το φιστίκι είναι ευεργετικό για την υγεία καθώς εκτός από τα βασικά συστατικά, όπως είναι οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και τα λιπίδια, είναι επίσης πηγή βιταμίνης E, νιασίνης και φολικού οξέος, όπως επίσης p-κουμαρικού οξέος που έχει αντιοξειδωτική δράση. Παρά τις ευεργετικές του ιδιότητες, το φιστίκι είναι το πιο κοινό αλλεργιογόνο στα παιδιά και τους ενήλικες και είναι υπεύθυνο για την πρόκληση των πιο σοβαρών συμπτωμάτων που σχετίζονται με την τροφική αλλεργία [38].

2.3.1 Σύσταση και αλλεργιογόνες πρωτεΐνες φιστικιού

Το φιστίκι περιέχει μεγάλο ποσοστό λίπους, το 50% του οποίου είναι ακόρεστα λιπαρά οξέα [39]. Τα λίπη του φιστικιού είναι κυρίως μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα και προσομοιάζουν σε έλαια τα οποία προέρχονται από λαχανικά. Επιπλέον περιέχει υδατάνθρακες σε ποσοστό 12 έως 15%, μεταξύ των οποίων άμυλο, κυτταρίνη, πηκτίνη και σακχαρόζη [40].

Η διατροφική αξία του φιστικιού είναι μεγάλη και συγκρίσιμη με αυτή τροφίμων υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, όπως το κρέας και το ψάρι, καθώς περιέχει περίπου 25% πρωτεΐνη κατά βάρος [39]. Ως προς την αλλεργιογόνο δράση του φιστικιού, μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δεκαεφτά αλλεργιογόνα (Ara h1-17). Ωστόσο, ως κύρια αλλεργιογόνα θεωρούνται τέσσερα, η Ara h1, η Ara h2, η Ara h3 και η Ara h6 [41]. Οι αλλεργιογόνες πρωτεΐνες του φιστικιού είναι όλες αποθηκευτικές πρωτεΐνες των καρπών [36].

Η Ara h1 είναι μία 7S βικιλίνη και αναγνωρίζεται από τις IgE του ορού των ατόμων που εμφανίζουν αλλεργία στο φιστίκι, σε ποσοστό >90%. Είναι ένα σταθερό ομο-τριμερές ή ολιγομερές με μοριακό βάρος 64,5 kDa. Η Ara h1 είναι ανθεκτική στη θερμική κατεργασία, ενώ είναι ευαίσθητη στην αποικοδόμηση από ένζυμα της πέψης, όπως η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η πεψίνη. Ωστόσο, τα πεπτίδια τα οποία παράγονται κατά την πέψη δεν χάνουν την αλλεργιογόνο δράση τους, καθώς οι επίτοποι παραμένουν στην πλειοψηφία τους ακέραιοι. Το ίδιο ισχύει και κατά τη θερμική κατεργασία, όπου ενώ συμβαίνουν μικρές αλλαγές στη δομή της Ara h1, δεν αλλάζει ιδιαίτερα η ικανότητα δέσμευσης των IgE με τους γραμμικούς επιτόπους [42-44].

Η Ara h2, είναι μία 2S κογγλουτίνη και έχει βρεθεί ότι αναγνωρίζεται από τις IgE ατόμων που εμφανίζουν αλλεργία στο φιστίκι σε ποσοστό >90% [45]. Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 17,5 kDa, η οποία σύμφωνα με μελέτες είναι ανθεκτική στις όξινες συνθήκες και στην πέψη από τα ένζυμα του γαστρεντερικού σωλήνα [46].

Η Ara h3 είναι μία 11S αποθηκευτική πρωτεΐνη της οικογένειας των γλυκινινών και όπως και η Ara h1 εμφανίζει υψηλή ευαισθησία στην πέψη [43]. Είναι μία ετεροπολυμερής πρωτεΐνη με συνολικό μοριακό βάρος περίπου 400 kDa, αποτελούμενη από μονομερή των 65 kDa [47]. Η Ara h3 αναγνωρίζεται από τις IgE ατόμων που εμφανίζουν αλλεργία στο φιστίκι σε ποσοστό 45% [48].

Η Ara h6 είναι μία 2S κογγλουτίνη και γι' αυτό το λόγο έχει πολλά παρόμοια δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με την Ara h2 [43]. Η Ara h6 παρουσιάζει 56% ομολογία με την Ara h2 και για το λόγο αυτό αντιδρά διασταυρούμενα προκαλώντας παρόμοια αλλεργική αντίδραση με την Ara h2 που συνοδεύεται από εμφάνιση σοβαρών αλλεργικών συμπτωμάτων. Όπως και η Ara h2 παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην πέψη και είναι και οι δύο σταθερές κατά τη θερμική κατεργασία και τη μετουσίωση [36,49]. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά καταδεικνύουν ότι η Ara h2 και η Ara h6 είναι πολύ καλοί δείκτες για την ανίχνευση φιστικιού σε τρόφιμα,

σε αντίθεση με την Ara h1 και την Ara h3, που είναι λιγότερο ανθεκτικές στις ίδιες συνθήκες κατεργασίας [43,50].

2.3.2 Αλλεργική απόκριση στο φιστίκι

Η αλλεργία στο φιστίκι επηρεάζει σχεδόν 0,8% των παιδιών μικρής ηλικίας και 0,6% των ενηλίκων. Σε αντίθεση με άλλες τροφικές αλλεργίες, η αλλεργία στο φιστίκι είναι πιθανόν να υφίσταται εφ' όρου ζωής [21]. Η αλλεργία στο φιστίκι διακρίνεται για τα σοβαρά συμπτώματα που τη συνοδεύουν σε σύγκριση με αλλεργίες που προκαλούνται από άλλα τρόφιμα λόγω του ότι μπορεί να οδηγήσει σε αναφυλακτικές αντιδράσεις, εν δυνάμει θανάσιμες, ακόμα και με ελάχιστη επαφή με το αλλεργιογόνο. Ένας ευπαθής οργανισμός μπορεί να παρουσιάζει αλλεργική αντίδραση είτε καταναλώνοντας απ' ευθείας φιστίκι είτε τρόφιμα που εμπεριέχουν φιστίκι. Η εκδήλωση των αλλεργικών συμπτωμάτων στο φιστίκι συνδέεται άμεσα με τον τρόπο κατεργασίας του. Στις δυτικές χώρες η αλλεργία στο φιστίκι παρουσιάζεται συνήθως σε ανθρώπους που καταναλώνουν ψημένο φιστίκι. Αντιθέτως, στην Κίνα η συχνότητα εμφάνισης της αλλεργίας στο φιστίκι είναι μικρότερη λόγω του ότι οι άνθρωποι καταναλώνουν βρασμένο ή τηγανητό φιστίκι και όχι ψημένο. Το ψήσιμο μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης των περιεχομένων στο φιστίκι αλλεργιογόνων, καθιστώντας τα ανθεκτικότερα σε όξινη αποικοδόμηση και κατά συνέπεια να αυξήσει την αλλεργιογόνο δράση των ψημένων φιστικιών [38]. Από την άλλη πλευρά, κατά το βράσιμο παρατηρείται δύο φορές μείωση στην αλλεργιογόνο δράση των φιστικιών, η οποία πιθανώς να οφείλεται σε απομάκρυνση μικρού μοριακού βάρους αλλεργιογόνων πρωτεϊνών του φιστικιού οι οποίες παραμένουν στο νερό [51]. Δεδομένων των σοβαρών αλλεργικών συμπτωμάτων που προκαλεί το φιστίκι και καθώς δεν υπάρχει άλλος τρόπος προφύλαξης των καταναλωτών εκτός από την αποφυγή, είναι πολύ σημαντική η ανίχνευση της παρουσίας φιστικιού ή παραγώγων του στα τρόφιμα.

2.4 Σόγια

Η σόγια (*Glycine max*) είναι ένα ιθαγενές φυτό της Ανατολικής Ασίας, της οικογένειας των Κυαμοειδών (*Fabaceae*) και ανήκει στα είδη των ψυχανθών. Είναι μονοετές φυτό που έχει χρησιμοποιηθεί στην Κίνα επί 5.000 χρόνια για να προσθέσει κυρίως άζωτο στο έδαφος, στο πλαίσιο της αμειψισποράς. Οι Ηνωμένες Πολιτείες είναι η πρώτη χώρα σε παραγωγή σόγιας παγκοσμίως με ποσοστό 38%, ακολουθεί η Βραζιλία (25%), η Αργεντινή (19%), η Κίνα (7%), η

Ινδία (3%), ο Καναδάς (2%) και η Παραγουάη (2%) [52]. Τόσο στην Ασία όσο και στις Δυτικές Χώρες η σόγια χρησιμοποιείται ευρέως σε πληθώρα τροφίμων. Επιπλέον οι πρωτεΐνες της σόγιας χρησιμοποιούνται συχνά ως συστατικά για την παρασκευή συσκευασμένων τροφίμων, όπως τα προϊόντα του κρέατος, των πουλερικών αλλά και σε προϊόντα αρτοποιίας, ζαχαροπλαστικής και γαλακτοκομίας [53,54]. Επίσης χρησιμοποιούνται σε παρασκευάσματα για βρέφη κυρίως ως εναλλακτική λύση για τη δυσανεξία στη λακτόζη και την αλλεργία στις πρωτεΐνες του αγελαδινού γάλακτος. Πέραν της χρησιμότητας της σόγιας στη βιομηχανία τροφίμων, αποτελεί σημαντικό συστατικό σε ποικιλία φαρμακευτικών σκευασμάτων [55]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η κατανάλωση σόγιας συντελεί στη μείωση της χοληστερόλης, βελτιώνει την πυκνότητα των οστών, μειώνει τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα και έχει αντικαρκινική δράση [53,56]. Τα παραπάνω οφέλη μπορούν να αποδοθούν στην παρουσία ισοφλαβονών, σαπωνινών, πρωτεϊνών και πεπτιδίων που εμπεριέχονται στη σόγια [57]. Η σόγια, πέραν των ωφέλιμων για την υγεία ιδιοτήτων της, σχετίζεται και με την τροφική αλλεργία. Η αποφυγή της σόγιας από τη διατροφή καθίσταται δύσκολη καθώς χρησιμοποιείται ως συστατικό ποικίλων τροφίμων, η κατανάλωση των οποίων αυξάνεται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση του αριθμού των ατόμων που εμφανίζουν αλλεργικά συμπτώματα στη σόγια [58].

2.4.1 Σύσταση και αλλεργιογόνες πρωτεΐνες της σόγιας

Η σόγια θεωρείται ως θαυματουργό φυτό λόγω των πολλών χρήσεών της, των ευεργετικών για την υγεία συστατικών της και της υψηλής διατροφικής αξίας της. Αποτελείται από υδατάνθρακες σε ποσοστό 31%, κυρίως σακχαρόζη, ραφινόζη και σταχιόζη. Επιπλέον περιέχει και αδιάλυτους υδατάνθρακες, όπως κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη [59]. Οι ώριμοι σπόροι της σόγιας περιέχουν λιπίδια σε ποσοστά 18-25%, αποτελούμενα από 3% κορεσμένα λιπαρά οξέα, 4% μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με επικρατέστερο το λινελαϊκό οξύ. Η σόγια επίσης περιέχει 12% νερό και 5% ιχνοστοιχεία. Το μεγαλύτερο ποσοστό της σόγιας αποτελείται από πρωτεΐνες (38-50%).

Διαφορετικά κλάσματα των πρωτεϊνών της σόγιας, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως αλλεργιογόνα, έχουν απομονωθεί μέσω όξινης κατακρήμνισης και υπερφυγοκέντρωσης. Τα πιο συνήθη αλλεργιογόνα της πρωτεΐνης αυτής είναι τα 2S, 7S, 11S. Το τμήμα 2S περιλαμβάνει την α-κονγλυκινίνη, η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες μοριακού βάρους 18,2 kDa και 32,6 kDa, τους αναστολείς

θρυψίνης Kunitz και Bowman Birk, αλβουμίνες και κυτόχρωμα C. Το τμήμα 7S αποτελείται κυρίως από ένα τριμερές των 150-170 kDa, τη β-κονγλυκινίνη (περίπου 50%). Περιλαμβάνει επίσης τη γλυκοπρωτεΐνη Gly m Bd 30K, τη γλυκοπρωτεΐνη Gly m Bd 28K τη Gly m 1 και τη Gly m 2. Το τμήμα 11S αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από γλυκινίνες, οι οποίες είναι εξαμερείς μονάδες 320- 360 kDa [60].

Η β-κονγλυκινίνη (Gly m 5) και η γλυκινίνη (Gly m 6) είναι οι δύο κυρίαρχες αποθηκευτικές πρωτεΐνες στους σπόρους της σόγιας και αποτελούν περίπου το 80% του συνόλου των αποθηκευτικών πρωτεϊνών στη σόγια [61]. Η Gly m 5 είναι μία τριμερής πρωτεΐνη (150-200 KDa) και αποτελείται από διαφορετικούς συνδυασμούς τριών υπομονάδων, την α, την α' και τη β υπομονάδα [62]. Η α-υπομονάδα της Gly m 5 αναγνωρίζεται από τις IgE του ορού ατόμων που πάσχουν από αλλεργία στη σόγια, ενώ και οι άλλες δύο υπομονάδες εμφανίζουν αλλεργιογόνο δράση σε μικρότερο ποσοστό [63]. Η Gly m 6 είναι μία κύρια αποθηκευτική πρωτεΐνη που βρίσκεται στο 11S κλάσμα των πρωτεϊνών του σπόρου της σόγιας. Αποτελεί το 20% του ξηρού βάρους του σπόρου και θεωρείται ως το κύριο αλλεργιογόνο της σόγιας [61,64]. Είναι μία εξαμερής πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από πέντε υπομονάδες [62]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι επίτοποι των υπομονάδων της Gly m 6 στους οποίους δεσμεύονται οι IgE, είναι ταυτόσημοι με αυτούς της κύριας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης του φιστικιού Ara h3 [65].

Πέραν αυτών, και άλλες πρωτεΐνες της σόγιας παρουσιάζουν αλλεργιογόνο δράση όπως η προφιλίνη της σόγιας (Gly m 3) και η Gly m 4, η οποία έχει περιγραφεί ως επαγόμενη από το στρες πρωτεΐνη της σόγιας και είναι ομόλογη με άλλες πρωτεΐνες φυτών που σχετίζονται με αλλεργίες κυρίως μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης (πρωτεΐνες της γύρης και του μήλου). Επιπλέον, αλλεργιογόνο δράση εμφανίζουν η Gly m 1 και η Gly m 2, οι οποίες είναι αεροαλλεργιογόνες πρωτεΐνες, οι αλβουμίνες της σόγιας (τμήμα 2S) και η λεκιθίνη [66].

2.4.2 Αλλεργική απόκριση στη σόγια

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την κατεργασία της σόγιας προκειμένου να παραχθούν υποαλλεργικά προϊόντα, όπως είναι η υγρή ή ξηρή αποστείρωση ή μη θερμικές μέθοδοι, όπως η ενζυμική υδρόλυση και η ζύμωση [67]. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να μεταβάλουν την αλλεργιογόνο δράση της σόγιας είτε λόγω αδρανοποίησης, καταστροφής ή δημιουργίας νέων επιτόπων είτε

λόγω μεταβολής της στερεοδιαμόρφωσης των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ανάδειξη κρυμμένων επιτόπων. Αυτές οι μεταβολές διαφέρουν ανάλογα με το προϊόν και την κατεργασία του. Κάποια αλλεργιογόνα, όπως η Gly m 5 είναι ευαίσθητα στις συνήθεις μεθόδους κατεργασίας, ενώ άλλες πρωτεΐνες όπως η Gly m 6 είναι σχετικά σταθερές [68].

Η σόγια σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση ανήκει στα δεκατέσσερα πιο σημαντικά αλλεργιογόνα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρόκληση τροφικών αλλεργιών σε ποσοστό υψηλότερο του 90%. Σύμφωνα με τον FDA το 0,2-0,4% του πληθυσμού εμφανίζει αλλεργία στη σόγια. Ωστόσο, όπως αναφέρεται, ανήκει στην κατηγορία αλλεργιών οι οποίες εξαλείφονται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας ή της εφηβείας. Πέραν της πρόκλησης αλλεργικών αντιδράσεων λόγω άμεσης κατανάλωσης σόγιας, αλλεργικά συμπτώματα μπορούν να εκδηλωθούν επίσης μέσω διασταυρούμενης αντίδρασης με το φιστίκι ή την πρωτεΐνη της γύρης και συνήθως αυτό συμβαίνει στους ενήλικους και όχι στα παιδιά [69]. Για το λόγο αυτό, η ανίχνευση των πρωτεϊνών της σόγιας σε ποικιλία τροφίμων είναι καθοριστική για την υγεία των καταναλωτών.

2.5 Σιτάρι

Το σιτάρι είναι ένα φυτό της οικογένειας των ποσειδών (*Poaceae*), του γένους σίτου (*Triticum*), που καλλιεργείται παγκοσμίως και είναι δεύτερο σε παραγωγή μετά τον αραβόσιτο. Οι κύριες ποικιλίες σιταριού είναι δύο: η *Triticum durum* ή αλλιώς σκληρό σιτάρι που χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή των ζυμαρικών και η *Triticum aestivum* ή μαλακό σιτάρι που είναι το πλέον κατάλληλο για την αρτοποιία. Ο καρπός του σιταριού χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή αλευριού, αλκοολούχων ποτών και ζωοτροφών [70].

2.5.1 Πρωτεΐνες σιταριού

Οι πρωτεΐνες του σιταριού όπως και άλλων σχετικών δημητριακών, σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά Osborne, η οποία είναι και η επικρατέστερη, κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες, ανάλογα με τη διαλυτότητα τους σε διαφορετικούς διαλύτες: τις αλβουμίνες, τις σφαιρίνες, οι οποίες είναι κυτταροπλασματικές ή ενεργά μεταβολικές πρωτεΐνες και τις προλαμίνες και τις γλουτελίνες, οι οποίες είναι αποθηκευτικές πρωτεΐνες (γλουτένη) [71].

Η γλουτένη είναι η ελαστική μάζα η οποία απομένει μετά την έκπλυση της ζύμης από σιτάρι, προκειμένου να απομακρυνθεί το άμυλο και τα υδατοδιαλυτά συστατικά. Περαιτέρω έκπλυση με διάλυμα αλάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απομακρυνθεί το κλάσμα αλβουμινών και σφαιρινών. Το εναπομένον κολλώδες στερεό περιέχει πρωτεΐνες σε ποσοστό 75- 85%, οι οποίες είναι οι κύριες αποθηκευτικές πρωτεΐνες του σιταριού και διακρίνονται βάσει της διαλυτότητας τους σε αλκοολικά διαλύματα (αιθανόλη 60%) σε δύο κύριες ομάδες, τις αδιάλυτες γλουτενίνες και τις διαλυτές γλιαδίνες [72].

Οι γλουτενίνες, οι οποίες είναι ένα είδος γλουτελινών, είναι αδιάλυτες σε αλκοολικά διαλύματα και διαλυτές σε αραιά οξέα και αλκάλια [73]. Οι γλουτενίνες απαρτίζονται από συσσωματώματα υπομονάδων υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία σταθεροποιούνται μέσω ενδο- και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δισουλφιδικών δεσμών. Το μοριακό βάρος των συσσωματωμάτων αυτών μπορεί να υπερβαίνει τα 3000 kDa [74] και είναι υπεύθυνα για την ελαστικότητα της ζύμης [75].

Οι γλιαδίνες, οι οποίες ανήκουν στις προλαμίνες, είναι μονομερείς πρωτεΐνες, είναι σφαιρικές και έχουν πολύ μικρότερο μοριακό βάρος (30-80 kDa) σε σχέση με τις γλουτενίνες [76]. Είναι διαλυτές σε αλκοολικά διαλύματα και ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες, ομόλογες μεταξύ τους, βάσει της κινητικότητας τους σε χαμηλό pH σε ηλεκτροφόρηση πηκτής, την α-, τη β-, τη γ- και την ω-. Οι ενυδατωμένες γλιαδίνες εμφανίζουν πολύ μικρότερο ποσοστό ελαστικότητας και συνοχής σε σχέση με τις γλουτενίνες, ενώ είναι υπεύθυνες για τις ιξώδεις ιδιότητες της ζύμης. Παράλληλα, προσδίδουν στη ζύμη τη δυνατότητα να «φουσκώσει» [72]. Οι α-, β- και γ- γλιαδίνες είναι τα κυρίαρχα συστατικά, ενώ η ω- γλιαδίνη βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερη αναλογία [72,77]. Παρ' όλα αυτά, οι ω- γλιαδίνες εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό σε διάφορες ευαισθησίες, μεταξύ των οποίων είναι και η τροφική αλλεργία [78].

2.5.2 Αλλεργία στο σιτάρι

Αλλεργία στο σιτάρι μπορεί να προκύψει ύστερα από εξωτερική επαφή, κατάποση ή εισπνοή προϊόντων του σιταριού καθώς και σχετικών δημητριακών, όπως το κριθάρι, η σίκαλη και τα λοιπά. Τα προϊόντα του σιταριού μπορεί να λειτουργήσουν ως ένα κλασικό ρυθμιζόμενο από IgE-αλλεργιογόνο, επηρεάζοντας το δέρμα, τον αναπνευστικό σωλήνα ή το έντερο και ως εξ επαφής αλλεργιογόνο προκαλώντας

κνησμό ή ατοπική δερματίτιδα [79]. Γνωστά είδη αλλεργίας που προκαλούνται από πρωτεΐνες του σιταριού είναι η αναφυλαξία ύστερα από άσκηση καθώς και το «άσθμα αρτοποιού» [80,81].

Ωστόσο, πέραν αυτών, μία ιδιαίτερα σημαντική υπερευαισθησία, η οποία μπορεί να προκύψει μετά την κατανάλωση προϊόντων σιταριού είναι η δυσανεξία στη γλουτένη ή αλλιώς κοιλιοκάκη. Η κοιλιοκάκη θεωρείται ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, καθώς εκτιμάται ότι επηρεάζει περίπου το 1% του πληθυσμού της Ευρώπης, της Βόρειας και Νότιας Αμερικής, της Βόρειας Αφρικής και της Ινδίας [82]. Γι' αυτό το λόγο θα αναλυθεί περαιτέρω στο επόμενο υποκεφάλαιο.

2.5.3 Δυσανεξία στη γλουτένη ή κοιλιοκάκη

Η κοιλιοκάκη είναι μία αυτοάνοση διαταραχή του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου, η οποία προκαλείται από αντίδραση στη γλιαδίνη, μία προλαμίνη που βρίσκεται στο σιτάρι, καθώς και σε παρόμοιες πρωτεΐνες του κριθαριού, της σίκαλης και της βρώμης. Κατά την έκθεση ενός οργανισμού, που έχει γενετική προδιάθεση για κοιλιοκάκη, στη γλιαδίνη προκαλείται φλεγμονώδης αντίδραση, η οποία οδηγεί σε ατροφία των λαχνών του λεπτού εντέρου. Κατά συνέπεια παρεμποδίζεται η απορρόφηση πολύ σημαντικών θρεπτικών συστατικών από τις λάχνες, όπως ο σίδηρος, το ασβέστιο, το φολικό οξύ, καθώς επίσης οι βιταμίνες Α και D [82].

Παθογένεση κοιλιοκάκης:

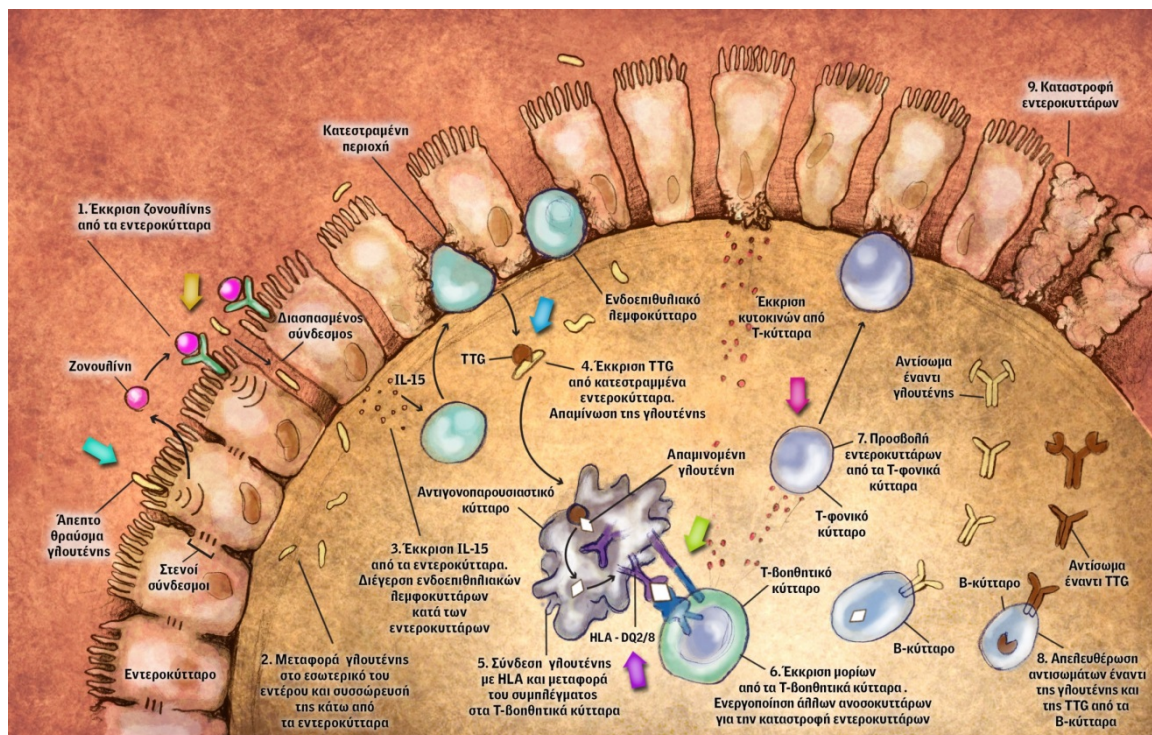
Όταν ένα τρόφιμο που περιέχει γλουτένη φτάνει στο έντερο υπό φυσιολογικές συνθήκες, ένζυμα που παράγονται στον εντερικό βλεννογόνο διασπούν τη γλουτένη σε γλιαδίνη και γλουτενίνη. Η γλουτένη διεγείρει επίσης κύτταρα του εντέρου να απελευθερώσουν μία πρωτεΐνη που ονομάζεται ζονουλίνη, η οποία ρυθμίζει το άνοιγμα των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων του εντερικού επιθηλίου. Στην περίπτωση όμως της δυσανεξίας, ο λεμφικός ιστός του εντέρου, αξιολογεί τα πεπτίδια αυτά ως δυνητικά επιβλαβείς ουσίες, ενώ ταυτόχρονα οι συνδέσεις στα κύτταρα του εντέρου παραμένουν ανοιχτές, επιτρέποντας έτσι πολύ μεγαλύτερα μόρια πρωτεΐνης να εισέλθουν στο εσωτερικό του εντέρου. Αυτό εξηγείται λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της γλουτένης σε προλίνη και γλουταμίνη, η οποία την καθιστά ανθεκτική στην αποικοδόμηση από πεπτικά ένζυμα, με αποτέλεσμα να παραμένει άπεπτη, να διαπερνά το εσωτερικό του εντέρου και να συσσωρεύεται κάτω από τα επιθηλιακά κύτταρα (κύτταρα του εντέρου) [83]. Η γλουτένη διεγείρει τα κύτταρα του εντέρου να εκκρίνουν ιντερλευκίνη- 15 (IL-15), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τα ενδοεπιθηλιακά

λεμφοκύτταρα να μεταναστεύσουν στις λάχνες του εντέρου, όπου στρέφονται κατά των κυττάρων του εντέρου (έμφυτη ανοσολογική απόκριση) [84].

Κατά την προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση, η υψηλή περιεκτικότητα της γλουτένης σε προλίνη και γλουταμίνη την καθιστά εξαιρετικό υπόστρωμα για την ιστική τρανσγλουταμινάση 2 (TG2), η οποία φυσιολογικά βρίσκεται σε αδρανή μορφή. Όταν υπάρχει φλεγμονή απελευθερώνεται από τα κατεστραμμένα κύτταρα του εντέρου και απαμινώνει τη γλουτένη, μετατρέποντας τα κατάλοιπα γλουταμίνης σε αρνητικά φορτισμένα μόρια γλουταμινικού οξέος [85]. Τα κατάλοιπα αυτά σε συνδυασμό με την παρουσία των καταλοίπων προλίνης αυξάνουν την ικανότητα σύνδεσης των πεπτιδίων της γλουτένης με τους υποδοχείς αντιγόνων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξεως II (MHC II), αναφερόμενα και ως HLA-DQ2/8, που εκφράζονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Στη συνέχεια, το σύμπλεγμα πεπτιδίων-HLA παρουσιάζεται στα T-βοηθητικά κύτταρα (CD4+), τα οποία βρίσκονται στους λεμφαδένες του μεσεντερίου και έπειτα ενεργοποιούνται και μεταναστεύουν στη μαλακή στιβάδα του συνδετικού ιστού (lamina propria) του λεπτού εντέρου. Τα ειδικά για τη γλουτένη T1-βοηθητικά κύτταρα (Th1), αναγνωρίζουν τα απαμινομένα πεπτιδίδια γλουτένης και παράγουν κυτοκίνες, όπως η ιντερφερόνη γ (IFN- γ) και η ιντερλευκίνη- 21 (IL-21), ενώ παράλληλα ωθούν τα T-φονικά κύτταρα (T-killer cells) να καταστρέψουν τα κύτταρα του εντέρου [86]. Επιπλέον τα Th2 κύτταρα συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των B-κυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και παράγουν αντισώματα κατά της γλιαδίνης και της TG2 [87] (Εικόνα 2). Παρ' όλο που δεν είναι αποσαφηνισμένη η συμμετοχή των αντισωμάτων αυτών στην παθογένεση της κοιλιοκάκης, ενδέχεται να καταστρέφουν περεταίρω τα κύτταρα του εντέρου και αποτελούν έναν κατάλληλο δείκτη για τη διάγνωση της κοιλιοκάκης.

Τόσο για την αλλεργία όσο και για την κοιλιοκάκη, ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης είναι η αποφυγή κατανάλωσης σιταριού ή των προϊόντων που περιέχουν γλουτένη. Η εκτίμηση των μέγιστων συγκεντρώσεων γλουτένης που θα μπορούσαν να είναι ανεκτές για τους ευαίσθητοποιημένους καταναλωτές είναι κρίσιμης σημασίας. Για τους ανθρώπους που πάσχουν από κοιλιοκάκη, η ημερήσια πρόσληψη γλουτένης κυμαίνεται από 10 έως 100 mg. Για τους ανθρώπους που πάσχουν από αλλεργία, η ελάχιστη δόση η οποία μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση είναι κάτω από την κλίμακα του mg για τα παιδιά, ενώ για τους ενήλικους είναι σημαντικά υψηλότερη. Στη βιομηχανία τροφίμων είναι υποχρεωτική η αναγραφή των προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας

σε γλουτένη (≤ 100 ppm) ή ελεύθερων από γλουτένη (≤ 20 ppm). Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η ανίχνευση της ακριβούς συγκέντρωσης της γλουτένης στα τρόφιμα [84].



Εικόνα 2: Μηχανισμός καταστροφής εντερικού βλεννογόνου κατά την κοιλιοκάκη

2.6 Σημαντικότητα ανίχνευσης των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών

Όπως αναφέρθηκε στην υποπαράγραφο 1.2.1 η τροφική αλλεργία επηρεάζει 3-5% των ενηλίκων και 8% των παιδιών παγκοσμίως, γεγονός που την καθιστά εθνικό ζήτημα υγείας. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει θεραπεία για όσους πάσχουν από αλλεργία, ο μόνος τρόπος αντιμετώπισης είναι η αυστηρή αποφυγή κατανάλωσης αλλεργιογόνων τροφίμων ή τροφίμων που μπορεί να εμπεριέχουν αλλεργιογόνες ουσίες [88]. Ο Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφίμων των Η.Π.Α. (FDA) καθώς και η Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν θεσπίσει κανόνες και οδηγίες που επιβάλλουν την αναγραφή της ύπαρξης αλλεργιογόνων ουσιών στην ετικέτα των τροφίμων με στόχο να προστατεύσουν τους ευπαθείς καταναλωτές [19,20].

Μέχρι σήμερα δεν έχει καθοριστεί κατώτερη ποσότητα αλλεργιογόνου πρωτεΐνης ή τροφίμου που μπορεί να είναι επιβλαβής για έναν οργανισμό, εφόσον ακόμα και ίχνη μίας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης είναι ικανά να προκαλέσουν αλλεργική απόκριση [89]. Οι «ευαισθητοποιημένοι» καταναλωτές μπορεί να εκτεθούν τυχαία

σε αλλεργιογόνες πρωτεΐνες, καταναλώνοντας προϊόντα τα οποία δε θα έπρεπε να τα περιέχουν. Για τη βιομηχανία τροφίμων, τους παραγωγούς τροφίμων καθώς και τις αλυσίδες εστίασης είναι δύσκολο να εγγυηθούν ότι ένα προϊόν δεν περιέχει αλλεργιογόνα. Για το λόγο αυτό οι βιομηχανίες τροφίμων συνήθως πραγματοποιούν προληπτική επισήμανση της πιθανής παρουσίας «κρυμμένων αλλεργιογόνων» στα τρόφιμα. Η μόλυνση μπορεί να προκύψει τόσο κατά το στάδιο παραγωγής όσο και κατά το στάδιο καθαρισμού των εγκαταστάσεων, της αποθήκευσης ή/και της μεταφοράς των προϊόντων, κυρίως λόγω του ότι διαφορετικά είδη προϊόντων παράγονται στις ίδιες εγκαταστάσεις, σε κοινές γραμμές παραγωγής [90].

Η απομάκρυνση των αλλεργιογόνων μέσω του καθαρισμού των κοινών γραμμών παραγωγής μίας βιομηχανίας τροφίμων, θεωρείται ένα από τα πιο κρίσιμα στάδια για την αποφυγή επιμολύνσεων με αλλεργιογόνα. Η σημαντικότητα αυτού του σταδίου καταδεικνύεται από μελέτες στις οποίες παρουσιάζεται ότι ο ακατάλληλος εξοπλισμός καθαρισμού θεωρήθηκε αιτία για την πρόκληση αλλεργικών αντιδράσεων σε καταναλωτές από προϊόντα που είχαν επιμολυνθεί από πρωτεΐνες γάλακτος και φιστικιού [91-93]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η απομάκρυνση των πρωτεϊνών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των αλλεργιογόνων, παρουσιάζει μεγάλη δυσκολία ιδιαίτερα όταν αυτές έχουν μετουσιωθεί λόγω θέρμανσης και έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια των γραμμών παραγωγής [18]. Το πιο σημαντικό μέσο για την απομάκρυνση των αλλεργιογόνων ουσιών καθώς και για την αποστείρωση του εξοπλισμού σε μία βιομηχανία τροφίμων είναι το νερό. Ο καθαρισμός με βάση το νερό διακρίνεται σε τέσσερις τύπους: α) επιτόπιος καθαρισμός (CIP), όταν δεν απαιτείται αποσυναρμολόγηση των σωληνώσεων και το διάλυμα καθαρισμού μπορεί να ανακυκλώνεται, β) καθαρισμός COP, όταν τμήματα των σωληνώσεων μπορούν να αποσυναρμολογούνται και να καθαρίζονται σε δοχεία, γ) καθαρισμός με αφρό ή γέλη, δηλαδή τα χημικά καθαρισμού ψεκάζονται στις σωληνώσεις με τη μορφή αφρού ή γέλης και δ) χειρωνακτικός καθαρισμός, όπου υπάρχει πλήρης αποσυναρμολόγηση των σωληνώσεων. Οι σύγχρονες βιομηχανίες τροφίμων χρησιμοποιούν συστήματα CIP, λόγω του αυτοματοποιημένου καθαρισμού και της δυνατότητας επικύρωσης των διεργασιών αυτών [89]. Τα συμβατικά CIP συστήματα αποτελούνται από τέσσερις διαφορετικές δεξαμενές: μία που περιέχει κρύο νερό, μία που περιέχει οξύ, μία που περιέχει βάση και μία που περιέχει ατμό. Υπάρχουν συστήματα που περιέχουν μία επιπλέον δεξαμενή με ζεστό νερό [94]. Ανάλογα με τη φύση της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, τη μήτρα των τροφίμων και τις φυσικές τους ιδιότητες

καθώς και τις προς καθαρισμό επιφάνειες, επιλέγεται κατάλληλο πρωτόκολλο καθαρισμού με στόχο την απομάκρυνση των αλλεργιογόνων και την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας για τυχαία επιμόλυνση των τροφίμων [18].

Προκειμένου να εξασφαλιστεί και να επικυρωθεί η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού πρέπει να πραγματοποιείται έλεγχος δειγμάτων από το αρχικό προϊόν, ενδιαμέσων προϊόντων από διάφορα στάδια της γραμμής παραγωγής και ανάλυση του νερού έκπλυσης από το τελικό στάδιο καθαρισμού. Μία συνήθης μέθοδος για τον έλεγχο των πρωτοκόλλων καθαρισμού, πέραν της συλλογής νερού από το τελικό στάδιο καθαρισμού, είναι η λήψη δείγματος με βαμβάκι (swabs) κυρίως από συγκεκριμένες περιοχές των σωληνώσεων οι οποίες είναι δύσκολο να καθαριστούν λόγω σχεδιασμού της γραμμής παραγωγής, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα συσσώρευσης τροφών και επομένως υπολειμμάτων αλλεργιογόνων [95].

Οι βιομηχανίες τροφίμων για την αντιμετώπιση πιθανής επιμόλυνσης των προϊόντων τους με αλλεργιογόνα ακολουθούν πρωτόκολλα τόσο για τον έλεγχο των τροφίμων κατά τη διάρκεια των σταδίων της παραγωγής μέσω ανάλυσης κινδύνου και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP), όσο και κατά το τελικό στάδιο έκπλυσης. Οι έλεγχοι βασίζονται σε διαθέσιμες αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού συγκεκριμένων αλλεργιογόνων συστατικών στα τρόφιμα, προκειμένου να αποφασισθεί η αποδέσμευση ή μη των προϊόντων τους [96]. Λόγω της ιδιαίτερης σημασίας που έχει ο ταχύς και ακριβής προσδιορισμός των αλλεργιογόνων τόσο για τη δημόσια υγεία όσο και για τις βιομηχανίες τροφίμων, η επιστημονική κοινότητα καταβάλλει συνεχώς προσπάθειες για την ανάπτυξη ταχειών, ευαίσθητων και υψηλής ακρίβειας μεθόδων για την ανίχνευση όλων των αλλεργιογόνων τροφίμων που καθορίζονται από τη νομοθεσία. Οι μέθοδοι αυτές αναπτύσσονται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΛΛΕΡΓΙΟΓΟΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

3.1 Μέθοδοι ανίχνευσης αλλεργιογόνων πρωτεϊνών

Οι μέθοδοι της βιβλιογραφίας για την ανίχνευση αλλεργιογόνων στα τρόφιμα, είτε στοχεύουν άμεσα ένα αλλεργιογόνο, είτε κάποιο δείκτη που υποδηλώνει την παρουσία αλλεργιογόνων σε ένα τρόφιμο. Κατά γενική ομολογία, προκειμένου να προστατεύονται οι ευαίσθητοι σε τροφική αλλεργία καταναλωτές, έχουν προταθεί όρια τόσο σε επίπεδο αλλεργιογόνου τροφίμου (10-100 mg/kg) όσο και σε επίπεδο επιμέρους αλλεργιογόνων πρωτεϊνών (1-10 mg/kg), ανάλογα με το βαθμό δράσης τους και σε κάποιες περιπτώσεις όπως π.χ. για το φιστίκι που παρουσιάζει υψηλή αλλεργιογόνο δράση, ακόμα χαμηλότερα [97]. Παρ' όλα αυτά, η ανίχνευση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στα τρόφιμα καθίσταται δύσκολη λόγω του ότι αυτές μπορεί να βρίσκονται σε ίχνη ή να επικαλύπτονται από τη μήτρα του τροφίμου. Επιπλέον, πληθώρα τροφίμων μπορεί να εμπεριέχει περισσότερες από μία αλλεργιογόνες πρωτεΐνες [97]. Ως δείκτες για την ανίχνευση αλλεργιογόνων τροφίμων χρησιμοποιούνται τόσο πρωτεΐνες με αλλεργιογόνο δράση είτε τμήματα του DNA που αντιστοιχούν σε αλλεργιογόνες πρωτεΐνες. Λόγω της σημαντικότητας ανίχνευσης αλλεργιογόνων ουσιών στα τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε: ηλεκτροφορητικές και ανοσοηλεκτροφορητικές τεχνικές, μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό ή μη με φασματομετρία μάζας (MS), μέθοδοι ανίχνευσης DNA, ανοσοχημικές μέθοδοι και βιοαισθητήρες. Κατωτέρω θα περιγραφούν και θα αναλυθούν οι επιμέρους μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί, με έμφαση στις μεθόδους που αφορούν τα αλλεργιογόνα που στοχεύονται στην παρούσα διατριβή, καθώς και τα πλεονεκτήματα ή μειονεκτήματά τους.

3.2 Ηλεκτροφορητικές και ανοσοηλεκτροφορητικές τεχνικές

3.2.1 Ανοσο-ηλεκτροφόρηση πύραυλος (RIE)

Η RIE πραγματοποιείται σε πηκτή που περιέχει αντίσωμα έναντι του προς ανίχνευση αλλεργιογόνου. Οι πρωτεΐνες του δείγματος - αντιγόνα - μεταναστεύουν ανάλογα με την ηλεκτροφορητική κινητικότητά τους και σχηματίζουν ίζημα όταν η συγκέντρωσή τους είναι στη βέλτιστη αναλογία με το αντίσωμα (1:1) ώστε να σχηματίσουν αδιάλυτα ανοσοσυμπλέγματα και να καταβυθιστούν στην πηκτή. Τα

ανοσοασυμπλέγματα αυτά αποκτούν μορφή πυραύλου και σχηματίζονται με σταθερή αναλογία αντιγόνου/αντισώματος. Το ύψος του πυραύλου είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου που υπάρχει στο δείγμα. Η RIE έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό αυγού, φουντουκιού, γάλακτος και φιστικιού [98,99]. Παρ' όλα αυτά, η RIE δε χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των αλλεργιογόνων λόγω της χρονοβόρας και κοπιώδους προετοιμασίας της πηκτής καθώς και της ανοσοχρωστικής διαδικασίας [97].

3.2.2 SDS PAGE/Ανοσοαποτύπωση

Η μονοδιάστατη SDS/PAGE συνδυαζόμενη με ανοσοαποτύπωση αντιπροσωπεύει την πρότυπη διαδικασία για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών/αλλεργιογόνων. Το SDS μετουσιώνει και περιβάλλει τις πρωτεΐνες προσδίδοντάς τους ισχυρό αρνητικό φορτίο. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται βάσει της μοριακής τους μάζας και στη συνέχεια μεταφέρονται σε μία μεμβράνη προκειμένου να προσδιοριστούν μέσω ράδιο ή ένζυμο επισημασμένων αντισωμάτων. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό προσδιορισμό δυνητικά αλλεργιογόνων τροφίμων, πιο συγκεκριμένα πρωτεϊνών αμυγδάλου και φουντουκιού σε σοκολάτα, με όριο ανίχνευσης <5 mg/kg, όπως επίσης και για τον προσδιορισμό του φιστικιού σε μπάρες δημητριακών [100,101].

Μία εναλλακτική προσέγγιση είναι ο δι-διάστατος ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός. Σύμφωνα με αυτόν, στην πρώτη διάσταση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και στη δεύτερη με βάση τη μοριακή τους μάζα [36,102].

3.3 Υγρή χρωματογραφία/ HPLC-MS

Άλλες τεχνικές διαχωρισμού, όπως η υγρή χρωματογραφία (LC) και η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE), έχουν χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών και συνδέονται με διάφορα είδη ανιχνευτών, όπως οπτικής απορρόφησης, φθορισμού καθώς και με συστοιχίες φωτοδιόδων [103]. Τα συστήματα υγρής χρωματογραφίας είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον αναλυτικό και προπαρασκευαστικό διαχωρισμό πρωτεϊνών που βρίσκονται σε τρόφιμα. Μέχρι τώρα έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας, οι οποίες ανάλογα με τη στήλη που χρησιμοποιείται, διακρίνονται σε χρωματογραφία ιονανταλλαγής, χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και χρωματογραφία μοριακής διήθησης, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για το τελευταίο στάδιο καθαρισμού των αλλεργιογόνων [104-106]. Ο

καθαρισμός και η ταυτοποίηση ενός από τα σημαντικότερα αλλεργιογόνα φιστικιού (Ara-h1), έγινε το 1991 από τον Burks μέσω χρωματογραφίας ανιονανταλλαγής ακολουθούμενη από SDS PAGE/ ανοσοαποτύπωση [104]. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για μόρια με υδροφοβικό χαρακτήρα όπως οι πρωτεΐνες είναι η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης (RP-HPLC). Με τη μέθοδο αυτή έχουν προσδιορισθεί πληθώρα αλλεργιογόνων, μεταξύ των οποίων είναι η γλιαδίνη, η καζεΐνη, το φιστίκι και η σόγια [106-110]. Επίσης, το 2003 οι Ferreira & Caccote, ανέπτυξαν RP-HPLC μέθοδο για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο και κατσικίσιο γάλα [111]. Επιπλέον, χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή φθορισμού έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πρωτεϊνών γάλακτος μέσω παραγωγοποίησης των καταλοίπων κυστεΐνης [112]. Το 2010 αναπτύχθηκε CE και HPLC για την ανάλυση της α-λακταλβουμίνης και της β-γαλακτοσφαιρίνης σε σκόνη γάλακτος, σε φρέσκο γάλα και σε παρασκευάσματα για βρέφη [113]. Η υψηλή ικανότητα διαχωρισμού όσο και η αυτοματοποίηση των συστημάτων υγρής χρωματογραφίας, καθιστούν τα συστήματα αυτά κατάλληλα για σύνδεση με ακόμα πιο προηγμένες τεχνικές ανίχνευσης, όπως η φασματομετρία μάζας (MS). Έτσι, τα τελευταία χρόνια, έχει αναπτυχθεί σημαντικός αριθμός μεθόδων ανίχνευσης αλλεργιογόνων μέσω υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματογράφο μάζας.

Ένας φασματογράφος μάζας αποτελείται από τρία μέρη: την πηγή ιόντων, τον αναλυτή μαζών και τον ανιχνευτή. Για την ανίχνευση αλλεργιογόνων σε τρόφιμα οι μέθοδοι ιοντισμού που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως δύο τύπων: α) ιονισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από τη μήτρα (MALDI) και β) ιονισμός με ηλεκτροσπασμό (ESI). Από την άλλη, οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι αναλυτές μαζών είναι οι χρόνου πτήσης (TOF) και οι παγίδες ιόντων (IT). Για τον προσδιορισμό πεπτιδίων και αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, έχουν αναπτυχθεί τόσο μέθοδοι φασματομετρίας μαζών σε σειρά (MS^n), όσο και υβριδικά συστήματα MS όπως είναι το ESI-qTOF και το MALDI-TOF [114]. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη φασματομετρία μαζών μπορούν να διακριθούν επί της αρχής σε δύο είδη: στο πρώτο είδος ο αναλύτης είναι η αυτούσια πρωτεΐνη, η οποία ιονίζεται και αναλύεται μέσω του MS, ενώ στο δεύτερο είδος ο αναλύτης είναι χαρακτηριστικά πεπτίδια τα οποία προκύπτουν ύστερα από πέψη των πρωτεϊνών με πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως η τρυψίνη [115]. Μέχρι σήμερα έχει αναπτυχθεί πληθώρα μεθόδων σχετικά με την ανάλυση αυτούσιων πρωτεϊνών (πρώτο είδος). Ενδεικτικά κάποιες από αυτές σχετίζονται με την ανίχνευση α-

λακταλβουμίνης και β-λακτοσφαιρίνης σε προϊόντα γάλακτος [116,117] αλλά και της β-λακτοσφαιρίνης για την ανίχνευση της νοθείας κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό μέσω LC-ESI-MS/MS [118]. Επιπλέον, μέθοδοι MALDI-TOF-MS έχουν αναφερθεί για τον προσδιορισμό γλιαδίνης σε προϊόντα που χαρακτηρίζονται ελεύθερα γλουτένης, αλλά και για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό διαφόρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών όπως του φουντουκιού, της σόγιας, του αγελαδινού γάλακτος και του ροδάκινου [119]. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος MALDI-TOF δε θεωρείται κατάλληλη για την ανίχνευση μικρών πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν υποστεί αλλαγή κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τροφίμων. Αντίθετα, κατά την ανάλυση πεπτιδίων (δεύτερο είδος), ο προσδιορισμός των αλλεργιογόνων δεν επηρεάζεται από την τρισδιάστατη δομή τους και είναι εξίσου αποτελεσματικός ακόμα και μετά από την επεξεργασία των τροφίμων.

Στη δευτέρου είδους ανάλυση, οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιούν πεπτίδια από μία πρωτεΐνη, όπως προσδιορισμός Ara h1 σε σοκολάτα, προσδιορισμός κ-καζεΐνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα και προσδιορισμός αs1-καζεΐνης σε μπισκότα μέσω LC-ESI-QTOF-MS [120,121], ή πεπτίδια από διάφορες πρωτεΐνες για την ταυτοποίηση της παρουσίας ενός ή περισσότερων ειδών τροφίμων. Παραδείγματα της περίπτωσης αυτής είναι η ανίχνευση πεπτιδίων της πρωτεΐνης του φιστικιού (Ara h1, Ara h2, Ara h3) που προέκυψαν μετά από πέψη με τρυψίνη και ταυτοποιήθηκαν με nano ESI-QTOF-MS/MS, όπως και η ανίχνευση πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε χυμούς φρούτων [122,123]. Μία άλλη ενδιαφέρουσα εφαρμογή ήταν η ανίχνευση διαφορετικών ειδών γάλακτος για την παραγωγή τυριού [124].

Η τεχνική MS παρέχει τη δυνατότητα για ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών αλλεργιογόνων που προέρχονται από διαφορετικά τρόφιμα. Ενδεικτικά, έχει αναφερθεί μέθοδος για πέντε είδη ξηρών καρπών και αλλεργιογόνα φιστικιού που εμπεριέχονται στην ομάδα 11S των σφαιρινών μέσω LC-ESI-LIT-MS/MS [125]. Επίσης, ο Heick και η ομάδα του ανέπτυξαν μέθοδο LC-MS/MS/MS για τον προσδιορισμό οχτώ αλλεργιογόνων από αμύγδαλο, αυγό, φουντούκι, γάλα, φιστίκι, σόγια και καρύδι [103].

Η ποσοτικοποίηση σε επίπεδο πρωτεΐνης (πρώτο είδος) γίνεται τόσο με εσωτερικά όσο και με εξωτερικά πρότυπα, ενώ σε επίπεδο πεπτιδίων έχουν περιγραφεί τρεις μέθοδοι: με επισήμανση των πεπτιδίων με σταθερά ισότοπα, με χρήση ισοτοπικά επισημασμένων συνθετικών πεπτιδίων και πιο πρόσφατα χωρίς τη χρήση ιχνηθετών [115].

Παρ' όλο που οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας παρέχουν ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αλλεργιογόνων με υψηλή ακρίβεια, προϋποθέτουν την ύπαρξη ογκώδους και ακριβούς εξοπλισμού, καθώς και ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό. Επιπλέον, ένα σχετικό μειονέκτημα των μεθόδων είναι η ανάγκη προκατεργασίας του δείγματος ώστε να επιτευχθεί επαρκής καθαρισμός και χρωματογραφικός διαχωρισμός του προς ανάλυση δείγματος, και να αποφευχθεί η επίδραση συστατικών της μήτρας του δείγματος που θα μπορούσαν να μειώσουν την ακρίβεια ποσοτικοποίησης της μεθόδου [126].

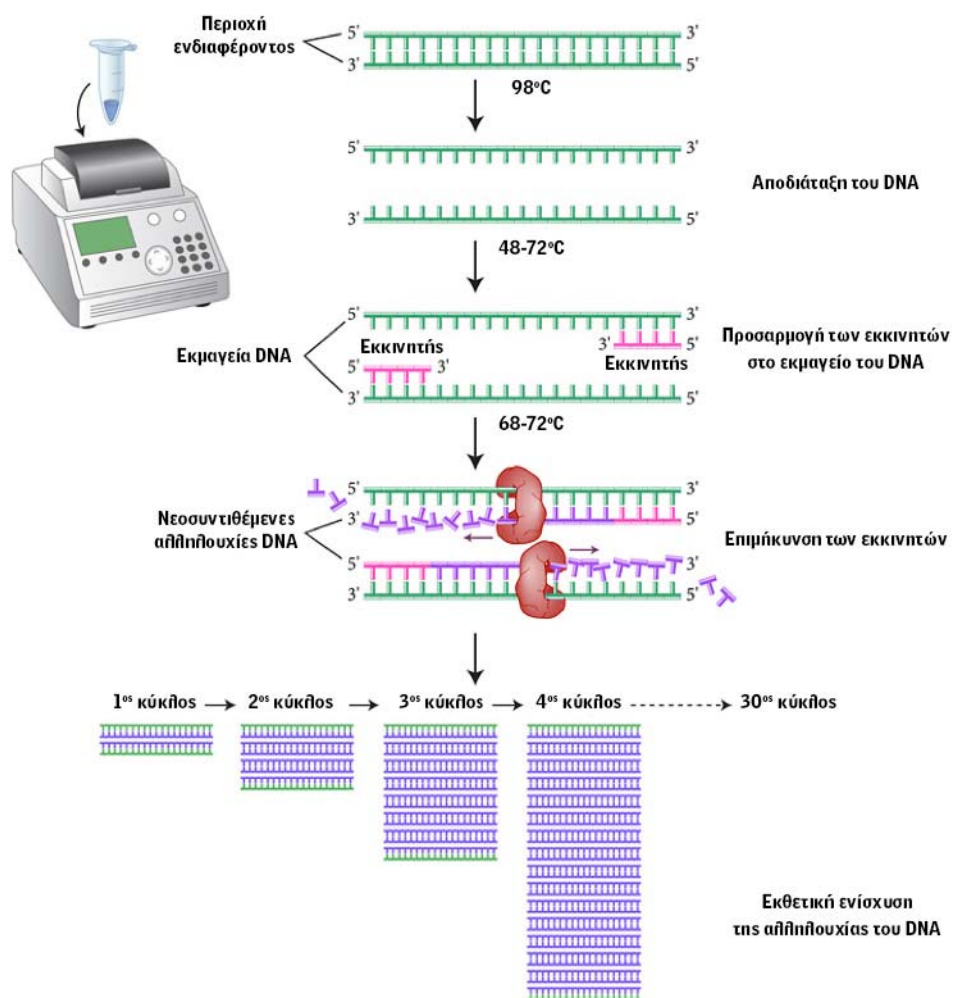
3.4 Μέθοδοι ανίχνευσης DNA

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση DNA ενδείκνυνται κυρίως για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων σε τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ή σε τρόφιμα των οποίων οι πρωτεΐνες αλλοιώνονται μετά από επεξεργασία. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλές μέθοδοι DNA για τον προσδιορισμό των αλλεργιογόνων και για την εφαρμογή τους στα διάφορα αλλεργιογόνα τρόφιμα [127,128].

PCR:

Οι PCR είναι μέθοδοι οι οποίες βασίζονται στην ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με χρήση συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων που λειτουργούν ως εκκινήτες και μπορούν να διακριθούν στην PCR τελικού σημείου (ποιοτική) και στην PCR πραγματικού χρόνου (ποσοτική) (Εικόνα 3). Οι αλληλουχίες-στόχοι του DNA δεν κωδικοποιούν απαραίτητα αλληλουχίες συγκεκριμένης αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, αλλά σε πολλές περιπτώσεις ανιχνεύεται το γενωμικό DNA του επιβλαβούς τροφίμου, ανεξάρτητα από την παρουσία της πρωτεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόκληση αλλεργικής αντίδρασης [129]. Στην PCR τελικού σημείου η ανίχνευση πραγματοποιείται μέσω ηλεκτροφόρησης μετά το τέλος της ενίσχυσης της αλληλουχίας- στόχου του DNA, ενώ στην PCR πραγματικού χρόνου η ανίχνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και μετά από κάθε κύκλο. Η ενίσχυση πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδίων-φάρων (molecular beacons). Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά περιέχουν αλληλουχία συμπληρωματική προς την στοχευόμενη αλληλουχία του DNA του τροφίμου και είναι σημασμένα στο ένα άκρο τους με φθορίζουσα ουσία ενώ στο άλλο με ουσία που προκαλεί απόσβεση φθορισμού (quencher). Με κατάλληλο σχεδιασμό της αλληλουχίας των ολιγονουκλεοτιδίων τα δύο άκρα τους, απουσία του συμπληρωματικού DNA του τροφίμου, υβριδίζονται και λόγω της γειννίας της

φθορίζουσας ομάδας με τον καταστολέα φθορισμού ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι χαμηλός. Με τον πολλαπλασιασμό των στοχευόμενων αλληλουχιών του DNA του τροφίμου και τον επακόλουθο υβριδισμό των μοριακών-φάρων με αυτές, τα άκρα των σημασμένων ολιγονουκλεοτιδίων απομακρύνονται και επομένως με κάθε κύκλο ενίσχυσης μέσω της PCR αυξάνεται η ένταση του μετρούμενου φθορισμού.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της ανάλυση μέσω PCR

Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοσθεί μέθοδοι PCR πολλαπλής ανίχνευσης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αλλεργιογόνων. Το 2011 ο Gomez Galan και η ομάδα του ανέπτυξε ποιοτική PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση μιτοχονδριακού DNA λούπινου και σόγιας σε επεξεργασμένα τρόφιμα με όριο

ανίχνευσης 2,5 mg/kg [130]. Δύο ποσοτικές εξαπλής ανίχνευσης PCR πραγματικού χρόνου αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό δώδεκα αλλεργιογόνων συστατικών σε τρόφιμα. Το πρώτο σύστημα ήταν κατάλληλο για ταυτόχρονο προσδιορισμό DNA από κάσιους, φιστίκι, φουντούκι, σέλερυ, σόγια και μουστάρδα, ενώ το δεύτερο για DNA από γάλα, αυγό, αμύγδαλο, σουσάμι, φιστίκι και καρύδι σε τρόφιμα όπως βραστά λουκάνικα, ρυζογκοφρέτες και σοκολάτα. Οι δύο PCR είχαν όριο ανίχνευσης τουλάχιστον 0,1% ως προς το ολικό βάρος του δείγματος για όλα τα αλλεργιογόνα συστατικά, παρ' όλα αυτά η ποσοτικοποίηση σε επίπεδο πρωτεΐνης δεν ήταν εφικτή [131]. Μία άλλη προσέγγιση που έχει χρησιμοποιηθεί ήταν η ανίχνευση οχτώ αλλεργιογόνων, μεταξύ των οποίων το φιστίκι, η γλουτένη και η σόγια, με ικανοποιητική ευαισθησία, μέσω της μεθόδου MLPA (multiplex-ligation probe amplification). Σύμφωνα με αυτή την τεχνική κατάλληλες συνθετικές αλληλουχίες επωάζονται με το απομονωμένο από το τρόφιμο DNA. Οι συνθετικές αλληλουχίες είναι σχεδιασμένες έτσι ώστε να αντιστοιχούν δύο για κάθε τμήμα του υπό ανίχνευση γονιδίου και να είναι απολύτως γειτονικές. Εφόσον υβριδιστούν και οι δύο αλληλουχίες σε τμήμα του υπό εξέταση γονιδίου, τα δύο τμήματα ενώνονται σε ένα με τη δράση της λιγάσης. Κατόπιν οι αλληλουχίες που προκύπτουν από τη σύνδεση χρησιμοποιούνται (με άλλους εκκινητές) ως μήτρες για τον πολλαπλασιασμό μέσω PCR [132]. Επίσης, η ομάδα του Tortajada ανέπτυξε μία μέθοδο μικροσυστοιχιών DNA ανιχνεύοντας ταυτόχρονα φουντούκι, φιστίκι και σόγια σε τρόφιμα με όριο ανίχνευσης το 1 μg/g σε μπισκότα, μαρμελάδα, κέικ και σκόνη γάλακτος [133].

Παρ' όλο που οι μέθοδοι DNA χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση αλλεργιογόνων συνήθως δεν υπάρχει συσχέτιση της ποσότητας του DNA και της ποσότητας της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης που βρίσκεται σε ένα τρόφιμο, πλην ελαχίστων εξαιρέσεων [134]. Επιπλέον, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις για την επιλογή του DNA ως δείκτη, λόγω του ότι η επεξεργασία των τροφίμων μπορεί να επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο την αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων και τις πρωτεΐνες. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις το DNA μπορεί να διαχωριστεί από τις πρωτεΐνες και μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [97]. Ένας ακόμα περιορισμός της PCR είναι ότι ορισμένα αλλεργιογόνα τρόφιμα δεν περιέχουν DNA, όπως οι πρωτεΐνες του λευκού μέρους του αυγού.

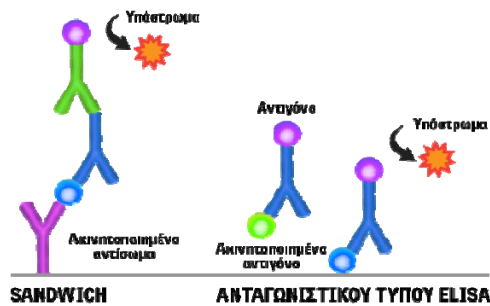
3.5 Ανοσοχημικές μέθοδοι

Οι ανοσοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούν κυρίως αντισώματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών σε βιολογικά ή άλλα δείγματα. Τα αντισώματα αυτά μπορεί να είναι είτε μονοκλωνικά, τα οποία αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο επίτοπο του αντιγόνου και συνήθως είναι πολύ εκλεκτικά, είτε πολυκλωνικά τα οποία αναγνωρίζουν πολλαπλούς επιτόπους πάνω στο αντιγόνο και είναι συχνά πιο κατάλληλα για την αναγνώριση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί κάποια ήπια τροποποίηση. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν την ανοσοαποτύπωση κηλίδων, τους ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς, καθώς και τις ανοσοχρωματογραφικές τεχνικές όπως οι συσκευές πλευρικής ροής (lateral flow immunoassays) και οι ταινίες εμβάπτισης (dipstick tests). Στη συνέχεια, θα αναλυθούν διεξοδικότερα οι αρχές αυτών των μεθόδων καθώς και θα αναφερθούν οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν βάσει αυτών για την ανίχνευση των σχετικών με την παρούσα διατριβή αλλεργιογόνων.

3.5.1 Ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση

Οι ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυσεις είναι οι πιο συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων (Εικόνα 4). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί εμπορικά διαθέσιμες συσκευασίες, οι οποίες στηρίζονται στους δύο τύπους ανοσοαναλύσεων έχουν αναπτυχθεί τόσο για την άμεση όσο και την έμμεση ανίχνευση των αλλεργιογόνων.

Κατά τη μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση, το αντίσωμα το οποίο είναι ακινητοποιημένο σε στερεά επιφάνεια και είναι ειδικό για ένα αντιγόνο αναγνωρίζει και συνδέεται σε έναν επίτοπο του αντιγόνου που βρίσκεται στο δείγμα, δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος (Ag-Ab). Ταυτόχρονα ή σε επόμενο στάδιο το σύμπλεγμα αυτό αντιδρά με ένα αντίσωμα ανίχνευσης το οποίο συνδέεται σε ένα διαφορετικό επίτοπο του αντιγόνου, δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα τύπου sandwich. Το αντίσωμα αυτό μπορεί να είναι επισημασμένο με ραδιοϊσότοπα, ένζυμα, φθορίζοντα, ηλεκτρενεργά, χημειοφωταυγή ή βιοφωταυγή μόρια [135,136]. Το σήμα που λαμβάνεται από τη δημιουργία του συμπλέγματος Ab-Ag συμπλέγματος είναι ανάλογο με την ποσότητα του αντιγόνου που υπάρχει στο δείγμα. Ο άμεσος αυτός προσδιορισμός είναι κατάλληλος για αναλύτες που μπορεί να έχουν τουλάχιστον δύο διαφορετικούς επιτόπους, παρέχοντας μεγάλη ευαισθησία ανίχνευσης.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου

Κατά την ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση (ELISA), το ακινητοποιημένο σε στερεά επιφάνεια αντιγόνο ανταγωνίζεται το αντιγόνο που βρίσκεται στο δείγμα για την κάλυψη των θέσεων δέσμησης του αντισώματος το οποίο προστίθεται στο δείγμα σε σταθερή συγκέντρωση χαμηλότερη της συγκέντρωσης του προς προσδιορισμό αντιγόνου. σταθερής ποσότητας του το σύνδεση σε ένα αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο. Στην περίπτωση του άμεσου προσδιορισμού το αντίσωμα που είναι ειδικό για το αντιγόνο είναι επισημασμένο με κάποιον ιχνηθέτη, ενώ στην περίπτωση του έμμεσου προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών του είδους από το οποίο έχει παραχθεί το ειδικό για το αντιγόνο αντίσωμα και το οποίο είναι επισημασμένο με έναν ιχνηθέτη. Σε περίπτωση απουσίας αντιγόνου στο δείγμα παρατηρείται η μέγιστη σύνδεση του ειδικού αντισώματος με το ακινητοποιημένο στη στερεά επιφάνεια αντιγόνο και επομένως, το σήμα που λαμβάνεται είναι αντιστρόφως ανάλογο προς τη συγκέντρωση του αντιγόνου που υπάρχει στο δείγμα [97].

Για την ανίχνευση αλλεργιογόνων συστατικών σε τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί τόσο ανταγωνιστικού όσο και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυσεις, μεταξύ αυτών και εμπορικά διαθέσιμες τυποποιημένες συσκευασίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως από τις βιομηχανίες τροφίμων, προσδιορίζοντας τόσο μεμονωμένα αλλεργιογόνα όσο και ολική αλλεργιογόνο πρωτεΐνη. Πιο αναλυτικά, για την ανίχνευση φιστικιού είναι εμπορικά διαθέσιμες τυποποιημένες συσκευασίες, πέντε από τις οποίες έχουν αξιολογηθεί για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών φιστικιού σε μπισκότα και σοκολάτα υγείας με ικανότητα ανίχνευσης από 5-10 mg/ kg [137]. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί ανταγωνιστικού τύπου ELISA τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης (LOD 2 mg/kg), όσο και σε επίπεδο επί μέρους αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, όπως Ara h1 και Ara h2 σε διάφορα προϊόντα τροφίμων (LOD Ara h1: 12 ng/mL, LOD Ara h2: 0,5 ng/mL) [138]. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί μη

ανταγωνιστικές μέθοδοι τύπου sandwich για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών φυσικικού σε σοκολάτα με όριο ανίχνευσης <10 ppm [139].

Όσον αφορά τη σόγια, έχει αναπτυχθεί πληθώρα ανοσοενζυμικών προσδιορισμών που βασίζονται είτε σε αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης σόγιας, είτε έναντι μεμονωμένων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, ή μετουσιωμένων/αναδιαταγμένων πρωτεϊνών σόγιας. Στην αγορά είναι διαθέσιμες τυποποιημένες συσκευασίες μεταξύ των οποίων δύο αξιολογήθηκαν για τον προσδιορισμό ολικής πρωτεΐνης σόγιας σε εμπορικά προϊόντα όπως λουκάνικα κοτόπουλου, αγελαδινό γάλα, τόνο και σούπες με όριο ανίχνευσης < 2 µg/mL [140]. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί τόσο ανταγωνιστικού όσο και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοπροσδιορισμοί για τον προσδιορισμό είτε γλυκινίνης είτε β- κογγλυκινίνης σε διάφορα προϊόντα σόγιας με όρια ανίχνευσης 1,63 ng/mL και 0,65 ng/mL αντίστοιχα [141,142].

Στην περίπτωση της γλουτένης είναι διαθέσιμος μεγάλος αριθμός ταχειών και ευαίσθητων μεθόδων μη ανταγωνιστικού τύπου με τη μορφή τυποποιημένων συσκευασιών με χρήση είτε μονοκλωνικών είτε πολυκλωνικών αντισωμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος μη ανταγωνιστικού τύπου sandwich, η οποία βασίζεται στο μονοκλωνικό αντίσωμα R5, έχει επικυρωθεί διεθνώς από την Codex Alimentarius για τον προσδιορισμό γλουτένης σε προϊόντα που χαρακτηρίζονται ως ελεύθερα γλουτένης [143,144]. Ωστόσο, για την ανίχνευση γλουτένης σε υδρολυμένα προϊόντα (όπως είναι το σιρόπι και η μπύρα), η ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση είναι πιο κατάλληλη απ' ό,τι η μέθοδος sandwich, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση πεπτιδίων μικρότερου μοριακού βάρους [145]. Σ' αυτή την κατεύθυνση, μία ανταγωνιστικού τύπου ELISA, η οποία βασίζεται στο μονοκλωνικό αντίσωμα R5 είναι ικανή να ανιχνεύει γλουτένη σε θερμικώς κατεργασμένα και υδρολυμένα τρόφιμα με όριο ανίχνευσης 0,36 µg/L [144].

Για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε γάλα διαφορετικών ζώων, όπως της κατσίκας, του προβάτου και του βουβαλιού καθώς και για την ανίχνευση πρωτεϊνών αγελαδινού γάλακτος σε τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί αρκετές ανοσοενζυμικές μέθοδοι. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν αναπτυχθεί κατά των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, των καζεϊνών ή μικρών πεπτιδίων προερχόμενων από πρωτεΐνες του γάλακτος. Στην αγορά υπάρχουν πολλές τυποποιημένες συσκευασίες που στηρίζονται σε μη ανταγωνιστικού και ανταγωνιστικού τύπου προσδιορισμούς για

τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων προερχόμενων από το γάλα με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονται από 0,1 έως 5 mg/kg [97]. Ιδιαίτερης σημασίας είναι η ανάπτυξη μεθόδων ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση βοείου γάλακτος και καζεϊνικού σε κασικίσιο και πρόβειο γάλα και τυρί μέσω αντισωμάτων κατά των γ -καζεϊνών, καθώς επίσης για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο μέσω αντισωμάτων κατά των β -καζεϊνών με όρια ανίχνευσης το 0,1% και 2%, αντίστοιχα [146,147]. Παράλληλα, μη ανταγωνιστικές μέθοδοι τύπου sandwich αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο, πρόβειο και βουβαλίσιο γάλα και τυρί με όριο ανίχνευσης <0,01% [148]. Μία ακόμα ενδιαφέρουσα εφαρμογή, είναι η ανάπτυξη μεθόδου ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό σκόνης αγελαδινού τυρόγαλου (που χρησιμοποιείται πολύ συχνά ως φτηνό παραπροϊόν για τη νοθεία γάλακτος) σε σκόνη αγελαδινού γάλακτος με όριο ανίχνευσης 0,1% [149].

3.5.2 Ανοσοχρωματογραφικές συσκευές πλευρικής ροής και ταινίες εμβάπτισης

Οι συσκευές πλευρικής ροής και οι ταινίες εμβάπτισης είναι απλοποιημένες μορφές της ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυσης. Είναι χαμηλού κόστους ταχείας ανίχνευσης φορητές συσκευές για ποιοτικό ή ημιποσοτικό προσδιορισμό και έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό για τη χρήση τους ενώ σε αρκετές περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επιτόπιους ελέγχους εάν δεν απαιτείται προκατεργασία δείγματος ή άλλος εξοπλισμός (π.χ. θερμοστάτηση ή συσκευή ανάγνωσης). Στις συσκευές πλευρικής ροής το δείγμα σε περίσσεια τοποθετείται σε σπογγώδες «μαξιλαράκι» (pad) και κινείται μέσω τριχοειδών φαινομένων σε επόμενο «μαξιλαράκι», το οποίο περιέχει το σημασμένο αντίσωμα ή αντιγόνο καθώς και άλατα για τη ρύθμιση του pH της ανοσοαντίδρασης. Το υγρό διαλυτοποιεί το αντιδραστήριο και το παρασύρει κατά μήκος μεμβράνης PVDF σε συγκεκριμένο σημείο της οποίας έχει ακινητοποιηθεί το αντιγόνο ή το αντίσωμα εάν η αρχή λειτουργίας της συσκευής είναι ανταγωνιστικού ή μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοπροσδιορισμός, αντιστοίχως. Το αντίσωμα ή το αντιγόνο σημαίνονται με έγχρωμα σωματίδια (κυρίως latex ή νανοσωματίδια χρυσού). Έτσι, όταν το επισημασμένο αντίσωμα φθάσει στο σημείο όπου βρίσκεται το ακινητοποιημένο αντιγόνο ή το σύμπλεγμα ακινητοποιημένου αντισώματος- αντιγόνου συνδέεται, ακινητοποιείται, συσσωρεύεται και δημιουργεί έγχρωμη κηλίδα ενώ η περίσσεια του απομακρύνεται. Οι ανοσοχρωματογραφικές ταινίες εμβάπτισης βασίζονται

ακριβώς στην ίδια αρχή με τη διαφορά ότι το δείγμα δεν τοποθετείται στο αντίστοιχο «μαξιλαράκι» αλλά η ταινία εμβαπτίζεται στο δείγμα μέχρι συγκεκριμένο σημείο. Στη διεθνή αγορά υπάρχουν πολλές εμπορικές διαθέσιμες συσκευασίες ταινιών εμβάπτισης και συσκευές πλευρικής ροής για την ανίχνευση αλλεργιογόνων φιστικιού, γλουτένης, αγελαδινού γάλακτος, σόγιας, αμυγδάλου, φουντουκιού και αυγού [128]. Ενδεικτικά, τέτοιες διατάξεις είναι διαθέσιμες για τον προσδιορισμό καζεΐνης και υπολειμμάτων ορού γάλακτος σε τρόφιμα με όριο <0,2 mg/kg. Επίσης, δύο dipstick τεστ τύπου sandwich και δύο συσκευές πλευρικής ροής είναι διαθέσιμες για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων φιστικιού και φουντουκιού με όριο ανίχνευσης ≤ 10 ng/mL [150,151]. Αντίστοιχες διατάξεις είναι διαθέσιμες και για τη γλουτένη.

Από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν σε αυτή την παράγραφο μόνο οι ενζυμοανασοχημικοί προσδιορισμοί ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου, καθώς και οι μέθοδοι που βασίζονται στο DNA, χρησιμοποιούνται για ανάλυση ρουτίνας από τις βιομηχανίες τροφίμων, ενώ οι υπόλοιπες μέθοδοι περιορίζονται σε ερευνητικούς σκοπούς [115]. Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι είναι ταχείες, ευαίσθητες και εκλεκτικές και χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάπτυξη τυποποιημένων συσκευασιών καθώς και ανοσοχρωματογραφικών τεστ διευκολύνοντας τόσο την ανίχνευση αλλεργιογόνων συστατικών όσο και τη διασταυρούμενη επιμόλυνση τροφίμων [152]. Παρ' όλα αυτά, εμφανίζουν τα εξής μειονεκτήματα: α) ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε περίπτωση κάποιας αλλαγής στη δομή της προς ανίχνευση πρωτεΐνης (π.χ. λόγω θερμικής ή πρωτεολυτικής κατεργασίας), β) ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης των αντισωμάτων που μπορεί να αναγνωρίζουν κάποια ομόλογη πρωτεΐνη πέραν της πρωτεΐνης- στόχου και γ) μη ικανότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης διαφορετικών αλλεργιογόνων. Η επιλογή κατάλληλου αντισώματος είναι κρίσιμης σημασίας και μπορεί να εξαλείψει την πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων.

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται ραγδαία ανάπτυξη στον τομέα των βιοαισθητήρων, οι οποίοι αποτελούν μία ελκυστική εναλλακτική λύση των ανοσοενζυμικών μεθόδων. Οι βιοαισθητήρες αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο πολλαπλών αναλυτών και έχουν ήδη εισαχθεί στον τομέα ανάλυσης τροφίμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

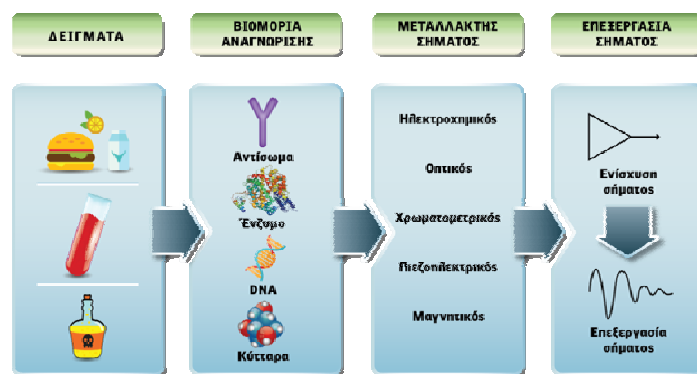
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

4.1 Εισαγωγή στους Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν μία κατηγορία χημικών αισθητήρων που παρέχουν τη δυνατότητα μετατροπής μίας βιολογικής απόκρισης σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα [153]. Το 1962 παρουσιάστηκε για πρώτη φορά η χρησιμότητα των βιοαισθητήρων από τον Leland C. Clark, έναν Αμερικανό επιστήμονα ο οποίος περιέγραψε πως μπορεί να γίνει ένας ηλεκτροχημικός αισθητήρας πιο «έξυπνος» συνδυάζοντας τον με ένζυμο. Η ιδέα αυτή έγινε εμπορικά εκμεταλλεύσιμη το 1975 από την εταιρεία Yellow Spring Instrument η οποία ανέπτυξε αισθητήρα για την ανίχνευση γλυκόζης στο αίμα. Έκτοτε, η ανάγκη για απλούστερους, ταχείς, και αξιόπιστους προσδιορισμούς βασιζόμενη στην ραγδαία ανάπτυξη της μικροηλεκτρονικής τεχνολογίας οδήγησε στη δημιουργία μίας αυξανόμενης τάσης για τη μεταφορά των αναλυτικών τεχνικών και των ανοσοπροσδιορισμών από τον πάγκο του εργαστηρίου σε μικροδιατάξεις όπως οι βιοαισθητήρες, οι οποίοι μπορούν να μετατραπούν σε φορητές συσκευές.

Σύμφωνα με τον ακριβή ορισμό κατά IUPAC [154], «βιοαισθητήρας» είναι ανεξάρτητη ολοκληρωμένη συσκευή η οποία είναι ικανή να παρέχει συγκεκριμένη ποσοτική ή ημιποσοτική αναλυτική πληροφορία χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιοχημικός υποδοχέας) το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με ένα φυσικοχημικό στοιχείο μετατροπής του σήματος (μεταλλάκτης). Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης είναι ακινητοποιημένο σε ένα στερεό φορέα με τον οποίο αποτελούν τη βιοδραστική επιφάνεια του αισθητήρα και είναι ικανό να αναγνωρίζει τη παρουσία, τη δραστικότητα ή τη συγκέντρωση ενός συγκεκριμένου αναλύτη σε δείγμα. Ανάλογα με το είδος της αλληλεπίδρασης που λαμβάνει χώρα κατά τη βιολογική αναγνώριση, οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τους βιοαισθητήρες κατάλυσης και τους βιοαισθητήρες συγγένειας [155,156]. Στην πρώτη κατηγορία το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης καταλύει μία συγκεκριμένη αντίδραση και η προς ανάλυση ουσία συμμετέχει είτε ως αντιδρόν ή ως προϊόν. Τα βιολογικά μόρια μπορεί να είναι ένζυμα, μικρόβια, οργανίδια, κύτταρα ή και ιστοί. Στη δεύτερη κατηγορία, το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης αλληλεπιδρά ειδικά και μη ομοιοπολικά με μόρια του αναλύτη προς σχηματισμό σταθερών συμπλόκων. Τα βιολογικά μόρια που χρησιμοποιούνται σε αυτή την κατηγορία μπορεί να είναι αντισώματα, αντιγόνα, νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA),

πρωτεΐνες, απταμερή, ιστόνες καθώς και φυσικοί ή συνθετικοί υποδοχείς. Ο μεταλλάκτης που βρίσκεται σε επαφή με τη βιοδραστική επιφάνεια ή ένα τμήμα της επιφάνειας στο οποίο έχει ακινητοποιηθεί το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης μετατρέπει τη φυσικοχημική μεταβολή, σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα με την παρεμβολή κατάλληλου ηλεκτρονικού συστήματος, το οποίο περιλαμβάνει ανιχνευτή, ενισχυτή, επεξεργαστή και καταγραφέα σήματος [153] (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Αναπαράσταση του τρόπου λειτουργίας των βιοαισθητήρων.

Η λειτουργικότητα ενός αισθητήρα καθορίζεται από τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των μετρήσεων που παρέχει, όπως είναι η ευαισθησία ανίχνευσης, το μεγάλο δυναμικό εύρος, η αξιοπιστία, η ειδικότητα, και ταχεία απόκριση, η οποία δεν πρέπει να επηρεάζεται από ηλεκτρικές ή περιβαλλοντικές παρεμβολές. Ιδανικά ο βιοαισθητήρας πρέπει να έχει μεγάλη διάρκεια ζωής, χαμηλό κόστος και δυνατότητα συνεχούς λειτουργίας και επαναχρησιμοποίησής του [156,157].

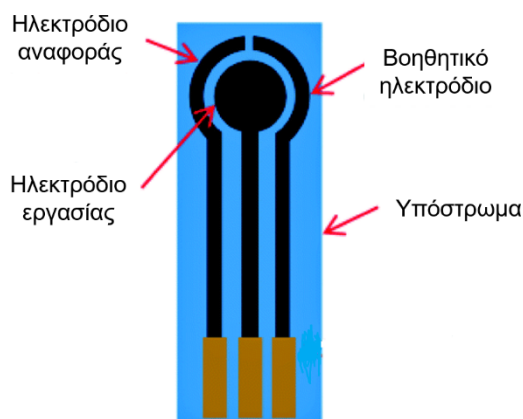
Ανάλογα με το είδος του μεταλλάκτη οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, πιεζοηλεκτρικούς και θερμικούς αν η φυσικοχημική παράμετρος που μεταβάλλεται είναι ηλεκτρισμός, φως, μάζα και θερμότητα, αντίστοιχα. Στα επόμενα υποκεφάλαια θα αναλυθούν περαιτέρω οι διαφορετικές κατηγορίες αισθητήρων.

4.2 Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι μία αρκετά διαδεδομένη κατηγορία αισθητήρων χάρη του χαμηλού κόστους οργανολογίας και της δυνατότητας σμίκρυνσής τους [158]. Στους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες, συνήθως, ο ηλεκτρενεργός αναλύτης οξειδώνεται ή ανάγεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου

εργασίας, το οποίο υποβάλλεται σε κατάλληλο δυναμικό, και το ηλεκτροχημικό σήμα καταγράφεται [159]. Βάση της ηλεκτροχημικής τεχνικής ανάλυσης οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες διακρίνονται κυρίως σε αμπερομετρικούς, βολταμετρικούς, ποτενσιομετρικούς και εμπεδομετρικούς [160-162].

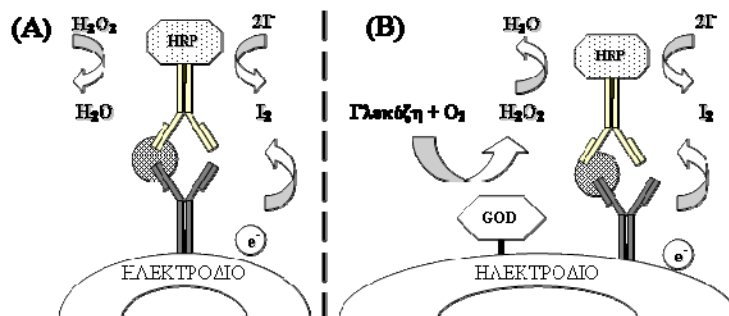
Η ανάγκη για γρήγορη, επιτόπια και χαμηλού κόστους ανάλυση, καθώς και για σμίκρυνση της οργανολογίας οδήγησε στην ανάπτυξη των εκτυπωμένων ηλεκτροδίων πλέγματος (screen printed electrodes, SPE). Η τεχνική εκτύπωσης μέσω πλέγματος στηρίζεται στην τεχνολογία «παχειάς» επίστρωσης χρησιμοποιώντας ένα πλέγμα- εκμαγείο (screen), ένα ελαστικό σάρωθρο (squeegee) και ένα υλικό εκτύπωσης που συνήθως αναφέρεται ως μελάνι ή πάστα. Το μελάνι αυτό κινείται υπό την πίεση του σαρώθρου και εκτυπώνεται μέσω του πλέγματος στο υπόστρωμα [163]. Τα υλικά εκτύπωσης είναι συνήθως Ag, Au, Pt, Pd, Ag/AgCl και C_(γραφίτης), ενώ σαν υποστρώματα χρησιμοποιούνται πλαστικά υμένα, κεραμικά, φύλλα χαρτιού, υφάσματα και ελαστικά υμένα. Με τη χρήση διαφορετικών πλεγμάτων είναι δυνατόν να κατασκευαστούν είτε μεμονωμένα ηλεκτρόδια είτε ολοκληρωμένες ηλεκτροχημικές διατάξεις, που αποτελούνται συνήθως από ένα ηλεκτρόδιο εργασίας, ένα αναφοράς και ένα βοηθητικό στο ίδιο υπόστρωμα (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση εκτυπωμένων ηλεκτροδίων πλέγματος, αποτελούμενου από ηλεκτρόδιο αναφοράς, ηλεκτρόδιο εργασίας και βοηθητικό ηλεκτρόδιο.

Οι ηλεκτροχημικοί ανοσοαισθητήρες βασίστηκαν κυρίως στη χρήση ενός ενζύμου ως ιχνηθέτη (Εικόνα 7A), ενώ τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται η καταλυτική σύνδεση με ένα δεύτερο ένζυμο, προκειμένου να επιτευχθεί ενίσχυση σήματος (Εικόνα 7B). Το ένζυμο αυτό είναι ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, στην οποία είναι επίσης ακινητοποιημένο και το αντιδραστήριο δέσμευσης [164]. Ο πιο διαδεδομένος ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας βασιζόμενος

σε εκτυπωμένα ηλεκτρόδια πλέγματος, είναι ο ενζυμικός αισθητήρας που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό γλυκόζης σε ολικό αίμα.



Εικόνα 7: Ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας με: A) χρήση ενός ενζύμου ως ιχνηθέτη (υπεροξειδάση της ραπανίδος- HRP) και B) καταλυτική σύνδεση με δεύτερο ένζυμο (οξειδάση της γλυκόζης- GOD).

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες έχουν βρει ευρεία εφαρμογή σε διάφορους τομείς μεταξύ των οποίων είναι η βιοϊατρική, οι περιβαλλοντικές μελέτες, καθώς και η ασφάλεια των τροφίμων [165]. Πιο συγκεκριμένα, για τα αλλεργιογόνα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μέθοδοι τόσο για έναν αναλύτη μεμονωμένα όσο και για δύο ταυτόχρονα. Το 2011 αναπτύχθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό καζεΐνης σε τυριά χρησιμοποιώντας έναν ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα βασιζόμενο σε νανοσωματίδια χρυσού και συνθετικό υμένιο αποτελούμενο από πολύ-L- αργινίνη/νανοσωληνές άνθρακα. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σε 30 min με όριο ευαισθησίας τα 50 ng/mL [166]. Την ίδια χρονιά, χρησιμοποιώντας μαγνητικά σφαιρίδια, αναπτύχθηκε ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας για την ανίχνευση γλιαδίνης σε μπίρα και αποβουτυρωμένο γάλα με όριο ευαισθησίας <25 ng/mL [167]. Το 2015 για πρώτη φορά αναπτύχθηκε ηλεκτροχημικός ανοσοαισθητήρας για τον προσδιορισμό της Ara h1 σε μπισκότα και σοκολάτα. Ο αισθητήρας αυτός αποτελείται από εκτυπωμένα ηλεκτρόδια πλέγματος, στα οποία είχαν ακινητοποιηθεί νανοσωματίδια χρυσού. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σε 3 ώρες και 50 min και είχε όριο ευαισθησίας 3,8 ng/mL [168]. Μία άλλη ερευνητική ομάδα προσδιόρισε την Ara h6 σε μπισκότα και σοκολάτα με παρόμοιο ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα, με όριο ανίχνευσης τα 0,27 ng/mL σε 60 min [169]. Την ίδια χρονιά αναπτύχθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό γλιαδίνης με ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα με όριο ευαισθησίας τα 0,2 μg/mL ενώ ο χρόνος ανάλυσης ήταν μία ώρα [170]. Το 2016 δημοσιεύτηκε εργασία για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των κύριων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών του φιστικιού Ara h1 και Ara h2 σε αλεύρι

και μπάρες σοκολάτας, με χρήση ηλεκτροχημικού ανοσοαισθητήρα βασιζόμενου σε μαγνητικά σφαιρίδια. Η ηλεκτροχημική μέτρηση πραγματοποιήθηκε μέσω εκτυπωμένων ηλεκτροδίων πλέγματος με όριο ευαισθησίας 18 ng/mL και 0,07 ng/mL για την Ara h1 και Ara h2, αντίστοιχα, και ο χρόνος ανάλυσης ήταν 2 ώρες [171]. Το 2016 αναπτύξαμε έναν αναδιπλούμενο ηλεκτροχημικό ανοσοαισθητήρα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό καζεΐνης και γ-ανοσοσφαιρινών αγελαδινού γάλακτος, χρησιμοποιώντας ως ιχνηθέτες κβαντικές κουκκίδες μολύβδου και καδμίου. Ο αισθητήρας κατασκευάστηκε με την τεχνική εκτύπωσης ηλεκτροδίων πλέγματος σε μεμβράνη nylon 66. Η ηλεκτροχημική μέτρηση εμφάνισε όριο ευαισθησίας 40 ng/mL για την καζεΐνη και τα 20 ng/mL για τις γ-ανοσοσφαιρίνες αγελαδινού γάλακτος ενώ ο χρόνος ανάλυσης ήταν 20 min και για τα δύο αλληργιογόνα [172].

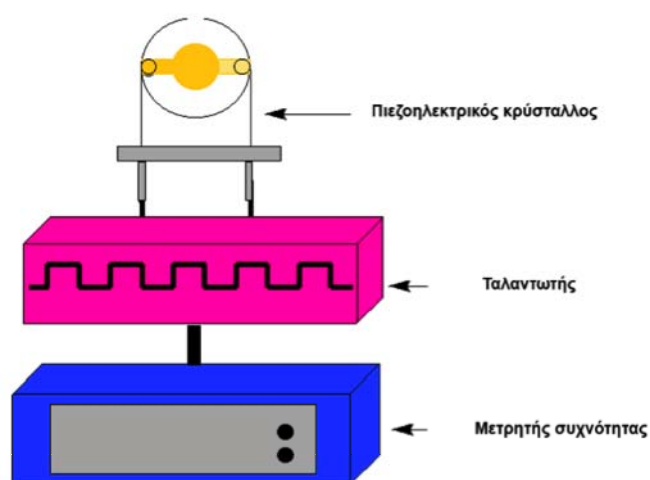
Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα όπως υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης, σχετικά χαμηλού κόστους οργανολογία και αυξημένη δυνατότητα σμίκρυνσης. Ωστόσο, τα αναλυτικά τους πλεονεκτήματα, σε αρκετές περιπτώσεις, αντισταθμίζονται από παρεμποδίσσεις προκαλούμενες από τη μήτρα του δείγματος λόγω άμεσης επαφής των ηλεκτροδίων με το δείγμα καθώς και λόγω της παρουσίας ηλεκτρενεργών συστατικών σε αυτό, ιδίως στην περίπτωση πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων ή τροφίμων [160].

4.3 Πιεζοηλεκτρικοί ή ακουστικοί αισθητήρες

Το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο αναφέρεται στη μετατροπή της ηλεκτρικής ενέργειας, σε ένα κρύσταλλο, σε μηχανική και αντίστροφα. Μια κατηγορία βιοαισθητήρων μάζας είναι οι αισθητήρες που βασίζονται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο και χρησιμοποιούν την αλλαγή στη συχνότητα συντονισμού ενός κύματος διάδοσης μέσω ενός πιεζοηλεκτρικού υλικού όπως είναι ο χαλαζίας (SiO_2), το οξειδίο λιθίου τανταλίου (LiTaO_3) και το οξειδίο λιθίου-νιοβίου (LiNbO_3). Οι αισθητήρες αυτής της κατηγορίας μπορούν να μετρήσουν μάζα, ιξώδες ή αλλαγές στην πυκνότητα στην επιφάνεια του αισθητήρα, δημιουργώντας και μεταδίδοντας ακουστικά κύματα κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη συχνότητα. Οι ακουστικοί αισθητήρες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο διάδοσης των ακουστικών κυμάτων στο πιεζοηλεκτρικό υλικό: στους αισθητήρες επιφανειακού ακουστικού κύματος (Surface Acoustic Wave, SAW), στους οποίους το ακουστικό κύμα διαδίδεται στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα και στους αισθητήρες ακουστικού κύματος όγκου (Bulk Acoustic Wave, BAW), όπου το ακουστικό κύμα διαδίδεται σε όλο τον όγκο του πιεζοηλεκτρικού υλικού [158,173,174]. Ο μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία

(Quartz Crystal Microbalance, QCM) ανήκει στη δεύτερη κατηγορία και είναι μία συσκευή η οποία μετρά πολύ μικρές μεταβολές μάζας στην επιφάνεια κρυστάλλου χαλαζία, ο οποίος βρίσκεται σε κατάσταση συντονισμού παρέχοντας υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης και δυνατότητα παρακολούθησης των μεταβολών μάζας στον ανιχνευτή κρυστάλλου σε πραγματικό χρόνο (Εικόνα 8). Επιπλέον, αποτελούν χαμηλού κόστους διατάξεις, έχουν δυνατότητα ανίχνευσης χωρίς τη χρήση ιχνηθετών και λόγω του μεγέθους τους μπορούν να είναι φορητές. Ωστόσο, παρότι διακρίνονται από υψηλή ευαισθησία, εμφανίζουν έλλειψη ακριβούς συσχέτισης της προστιθέμενης μάζας στην υγρή φάση με τη συχνότητα ταλάντωσης του κρυστάλλου καθώς και εξάρτηση της ευαισθησίας ανίχνευσης από την ομοιογένεια των ακινητοποιημένων βιομορίων στην επιφάνεια του κρυστάλλου [175,176].

Παρά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένοι βιοαισθητήρες περιορισμένος αριθμός εργασιών αναφέρεται στον τομέα της ανίχνευσης αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε τρόφιμα. Δύο από αυτές τις εργασίες περιγράφουν την ανάπτυξη QCM βιοαισθητήρων για την ανίχνευση γλιαδίνης σε τρόφιμα χωρίς τη χρήση ιχνηθετών με όρια ανίχνευσης 0,008 $\mu\text{g/mL}$ και 4 $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα [177,178]. Μία άλλη ενδιαφέρουσα εφαρμογή ήταν η ανάπτυξη QCM ανοσοαισθητήρα για τον προσδιορισμό νοθείας κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό γάλα. Για την ανίχνευση αναπτύχθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι χαρακτηριστικού τμήματος πρωτεΐνης (PSS 208 kDa) που υπάρχει μόνο στο αγελαδινό γάλα. Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ήταν 1 $\mu\text{g/mL}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα [179].



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διάταξης πιεζοηλεκτρικού αισθητήρα

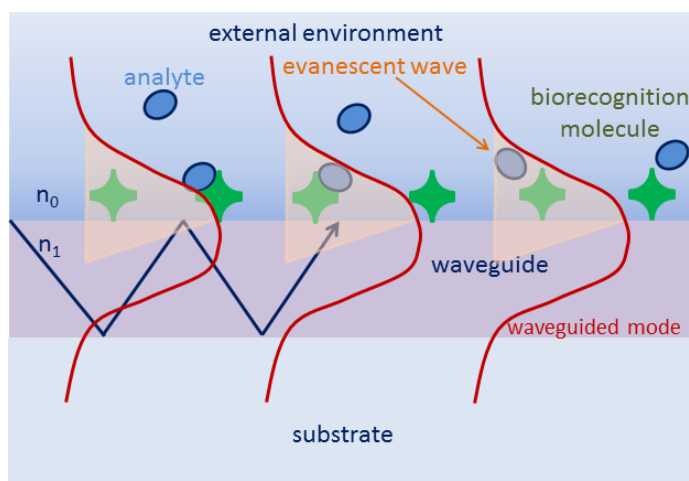
4.4 Οπτικοί βιοαισθητήρες

Οι οπτικοί ανοσοαισθητήρες έχουν αναπτυχθεί ευρέως τις τελευταίες δεκαετίες στον τομέα της υγείας, των φαρμάκων, του περιβάλλοντος αλλά και των τροφίμων [180] και παρουσιάζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων συγκριτικά με τις υπόλοιπες κατηγορίες αισθητήρων καθώς χαρακτηρίζονται από ταχείς και υψηλής ευαισθησίας προσδιορισμούς με μειωμένες παρεμποδίσεις από το δείγμα. Επιπλέον, παρέχουν δυνατότητα τόσο για παρακολούθηση των αντιδράσεων σε πραγματικό χρόνο με ή χωρίς τη χρήση ιχνηθετών όσο και για ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών αναλυτών στο ίδιο δείγμα [157,180].

Οι οπτικοί ανοσοαισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση μεταβολών στην ένταση της ακτινοβολίας η οποία μπορεί να ανακλάται, να διαθλάται, να διασπείρεται, να σκεδάζεται, ή να εκπέμπεται όταν αλληλεπιδρά με την ανοσοδραστική επιφάνεια.

Η λειτουργία των περισσότερων οπτικών ανοσοαισθητήρων βασίζεται στις αρχές της φασματοσκοπίας ολικής εσωτερικής ανάκλασης [181]. Σύμφωνα με την αρχή αυτή, η ακτινοβολία που διαδίδεται από οπτικά πυκνό υλικό με δείκτη διάθλασης n_1 σε οπτικά αραιό με δείκτη διάθλασης n_2 ($n_1 > n_2$) διαδίδεται μέσω ολικής ανάκλασης αποκλειστικά στο μέσο με το μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης (n_1) εφόσον προσπέσει στην επιφάνεια υπό γωνία (θ) μεγαλύτερη από την οριακή γωνία θ_c . Η οριακή γωνία προσδιορίζεται από τη σχέση $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1)$ [181,182]. Η διάδοση της οπτικής ακτινοβολίας μέσω ανακλάσεων ονομάζεται κυματοδήγηση, ενώ το μέσο στο οποίο ανακλάται (n_1) ονομάζεται οπτικός κυματοδηγός [181]. Κατά την ολική ανάκλαση στη μεσεπιφάνεια οι κάθετες συνιστώσες της κυματοδηγούμενης ακτινοβολίας δεν μηδενίζονται και επομένως δημιουργείται ένα ταλαντούμενο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο το οποίο διεισδύει στο υλικό με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης (n_2) και το οποίο ονομάζεται φθίνον κύμα (evanescent wave) ή φθίνον πεδίο (Εικόνα 9). Το φθίνον κύμα δεν διαδίδεται ως ηλεκτρομαγνητικό κύμα αλλά η ενέργειά του είναι χωρικά συγκεντρωμένη κοντά στην μεσεπιφάνεια ενώ η έντασή του μειώνεται εκθετικά συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια του κυματοδηγού. Το φθίνον κύμα χαρακτηρίζεται από το βάθος διείσδυσής του (dp) που ορίζεται ως η απόσταση από τη μεσεπιφάνεια όπου η ένταση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι ίση με το $1/e$ της τιμής της στην επιφάνεια του κυματοδηγού. Το βάθος διείσδυσης δίνεται από την σχέση: $dp = \lambda / [2\pi(n_1^2 \sin^2\theta - n_2^2)^{1/2}]$ όπου n_1 και n_2 είναι οι δείκτες διάθλασης των δύο υλικών, λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, και θ η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας. Το βάθος διείσδυσης είναι συνήθως της τάξης των μερικών

εκατοντάδων nm [182]. Έτσι η πλειονότητα των οπτικών ανοσοαισθητήρων βασίζεται στη χρήση οπτικών κυματοδηγών με δείκτη διάθλασης (n_1) μεγαλύτερο από αυτόν του δείγματος (n_2) ως στερεών φορέων ανοσοαντίδρασης σε συνδυασμό με κατάλληλες οπτικές πηγές και φωτοανιχνευτές [183].



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του φθίνοντος πεδίου. Η σύνδεση του αναλύτη με το ακινητοποιημένο βιοδραστικό μόριο στην επιφάνεια του κυματοδηγού λαμβάνει χώρα εντός του φθίνοντος πεδίου.

Οι οπτικοί ανοσοαισθητήρες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στους ανοσοαισθητήρες που βασίζονται στη χρήση ιχνηθετών όπως κάποιο αντιδραστήριο με ιδιότητες φθορισμού, χημειοφωταύγειας ή ακόμα και μαγνητικά νανοσωματίδια ή σωματίδια μετάλλων και στους ανοσοαισθητήρες που δεν απαιτούν τη χρήση ιχνηθετών.

4.5.1 Οπτικοί ανοσοαισθητήρες με χρήση ιχνηθετών

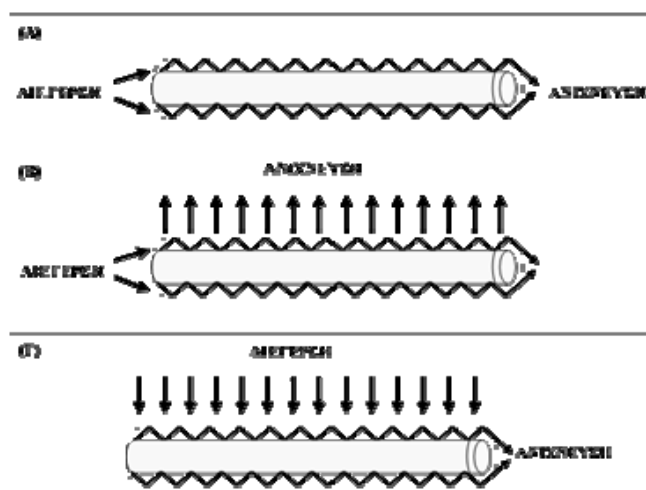
Οι ανοσοαισθητήρες με χρήση ιχνηθετών είναι κυρίως ανοσοαισθητήρες φθορισμού. Η ανίχνευση με ιχνηθέτες φθορισμού πραγματοποιείται μέσω διέγερσης της φθορίζουσας ουσίας με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος που αντιστοιχεί στο μέγιστο του μήκους κύματος απορρόφησης της ουσίας και εκπομπή φωτονίων μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με την ακτινοβολία διέγερσης. Ανάλογα με τη μορφή του οπτικού κυματοδηγού που χρησιμοποιείται, οι αισθητήρες φθορισμού διακρίνονται σε αισθητήρες οπτικών ινών, επίπεδους και τριχοειδείς.

Οι οπτικές ίνες αποτελούνται από γυαλί ή πολυμερές και έχουν τη δυνατότητα να μεταδίδουν ταυτόχρονα με διαδοχικές ανακλάσεις ένα ή περισσότερα οπτικά σήματα σε μεγάλες αποστάσεις με ελάχιστες απώλειες. Οι βιοαισθητήρες οπτικών ινών διακρίνονται σε εκείνους που βασίζονται στο φθίνον κύμα και στα οπτροδία [184]. Το φθίνον κύμα προκαλείται, όπως προαναφέρθηκε, από το κυματοδηγούμενο φως και διεγείρει τα φθορίζοντα μόρια τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί στην βιοδραστική επιφάνεια που έχει σχηματιστεί σε ένα τμήμα της πλευρικής επιφάνειας της ίνας. Στα οπτροδία (optrodes) [185] το φως εκπέμπεται από κατάλληλη πηγή κυματοδηγείται μέσα από την ίνα στο άλλο άκρο της, όπου βρίσκεται η βιοδραστική επιφάνεια. Ο φθορισμοεπισημασμένος αναλύτης ο οποίος είναι ακινητοποιημένος στη βιοδραστική επιφάνεια διεγείρεται και η εκπεμπόμενη ακτινοβολία κυματοδηγείται μέσω της ίνας στον ανιχνευτή. Τα βιο-οπτροδία επιτρέπουν τη μέτρηση δειγμάτων πολύ μικρού όγκου γεγονός το οποίο τα καθιστά κατάλληλα για κλινικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές καθώς επίσης και για παρακολούθηση της βιομηχανικής παραγωγής [186].

Μία άλλη κατηγορία ανοσοαισθητήρων με χρήση ιχνηθετών είναι οι ανοσοαισθητήρες επίπεδης γεωμετρίας, οι οποίοι χρησιμοποιούν επιφάνειες από γυαλί ή πολυμερές ως στερεό φορέα και ως οπτικό κυματοδηγό. Η μεγαλύτερη πλειοψηφία των επίπεδων ανοσοαισθητήρων βασίζεται στην αρχή της ολικής εσωτερικής ανάκλασης φθορισμού (TIRF) [184] σύμφωνα με την οποία μόνο τα φθορίζοντα μόρια που είναι ακινητοποιημένα στη βιοδραστική επιφάνεια ή εκείνα που βρίσκονται μέσα στο πεδίο δράσης του φθίνοντος κύματος διεγείρονται από την κυματοδηγούμενη ακτινοβολία. Στη συνέχεια τα μόρια αυτά μετά από τη διέγερσή τους εκπέμπουν φωτόνια τα οποία συλλέγονται από ένα κατάλληλο ανιχνευτή ο οποίος είναι τοποθετημένος κάθετα ως προς τον άξονα του κυματοδηγού. Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου ανίχνευσης είναι ότι ελαχιστοποιείται η επίδραση της μήτρας του δείγματος κατά τον ανοσοπροσδιορισμό και επιτυγχάνεται φυσική διάκριση ανάμεσα στα δεσμευμένα και τα ελεύθερα μόρια με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η μέτρηση σε πραγματικό χρόνο χωρίς να μεσολαβούν στάδια έκπλυσης.

Μία άλλη κατηγορία ανοσοαισθητήρων είναι οι τριχοειδείς ανοσοαισθητήρες φθορισμού, οι οποίοι μπορούν να διακριθούν με βάση το τρόπο ανίχνευσης του ιχνηθέτη σε τρεις κατηγορίες. Στη πρώτη κατηγορία, η ανίχνευση του ιχνηθέτη πραγματοποιείται απευθείας στο τριχοειδές [187,188] ενώ στη δεύτερη κατηγορία η ανίχνευση λαμβάνει χώρα μετά από μεταφορά του ιχνηθέτη σε κατάλληλο ανιχνευτή εκτός του τριχοειδούς [189]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η τρίτη

κατηγορία στην οποία κατατάσσονται ανοσοαισθητήρες όπου η ανίχνευση του ιχνηθέτη πραγματοποιείται μέσω του φθίνοντος κύματος καθώς τα τριχοειδή αξιοποιούνται και ως οπτικοί κυματοδηγοί [190,191]. Η ανίχνευση των ακινητοποιημένων φθορίζοντων μορίων στην επιφάνεια του τριχοειδούς μετά την ανοσοαντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους εξής τρόπους (Εικόνα 10): Α) διέγερση των μορίων μέσω κυματοδότησης της ακτινοβολίας διέγερσης και ανίχνευση της ακτινοβολίας εκπομπής που κυματοδηγείται, Β) με διέγερση των μορίων μέσω κυματοδότησης της ακτινοβολίας διέγερσης κατά μήκος του τριχοειδούς και ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κάθετα προς τον άξονα του κυματοδηγού, και Γ) με διέγερση κάθετα προς τον άξονα του τριχοειδούς και ανίχνευση της ακτινοβολίας εκπομπής που κυματοδηγείται. Οι ανοσοαισθητήρες αυτού του είδους πλεονεκτούν ως προς το μικρό όγκο του δείγματος που απαιτείται και ως προς το μικρό χρόνο επώασης λόγω των μικρών διαστάσεων του περιέκτη της αντίδρασης που επιταχύνει τη διάχυση.



Εικόνα 10: Εφαρμογές του τριχοειδούς ως οπτικού κυματοδηγού. (Α) Διέγερση και ανίχνευση μέσω του φθίνοντος κύματος, (Β) διέγερση μέσω του φθίνοντος κύματος και απευθείας ανίχνευση κάθετα ως προς το επίπεδο διέγερσης και (Γ) διέγερση κάθετα ως προς τον άξονα του τριχοειδούς και ανίχνευση μέσω του φθίνοντος κύματος.

Οι αισθητήρες που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης σε σχέση με τους αισθητήρες που δε χρησιμοποιούν ιχνηθέτες. Ωστόσο, η χρήση ιχνηθετών προϋποθέτει την επισήμανση των βιομορίων η οποία ενδέχεται να επηρεάσει αρνητικά τη δέσμευσή τους από τα ειδικά μόρια αναγνώρισης. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι ο ιχνηθέτης είναι πιθανό να καταλάβει τις περιοχές πρόσδεσης ή να παρεμποδίσει στερεοχημικά τη

βιομοριακή αλληλεπίδραση. Ένα ακόμα μειονέκτημα είναι ότι η επισήμανση αυξάνει το χρόνο προετοιμασίας του δείγματος καθώς επίσης και το κόστος της ανάλυσης.

4.5.2 Οπτικοί ανοσοαισθητήρες χωρίς τη χρήση ιχνηθέτη

Η ανάγκη για άμεση και αξιόπιστη ανίχνευση αναλυτών οδήγησε στην ανάπτυξη οπτικών βιοαισθητήρων χωρίς τη χρήση ιχνηθετών έτσι ώστε να μην απαιτείται τροποποίηση των αντιδραστηρίων, να υπάρχει δυνατότητα καταγραφής της αντίδρασης καθώς και των κινητικών μετρήσεων σε πραγματικό χρόνο και να μειώνεται τόσο ο χρόνος όσο και το κόστος της ανάλυσης. Οι αισθητήρες αυτού του τύπου βασίζονται στην άμεση ανίχνευση των αλλαγών των οπτικών ιδιοτήτων στη επιφάνεια όπου πραγματοποιείται η βιομοριακή αντίδραση και πλεονεκτούν ως προς το ότι ο μεταλλάκτης είναι γαλβανικά απομονωμένος από τα ηλεκτρονικά διέγερσης και ανίχνευσης [180].

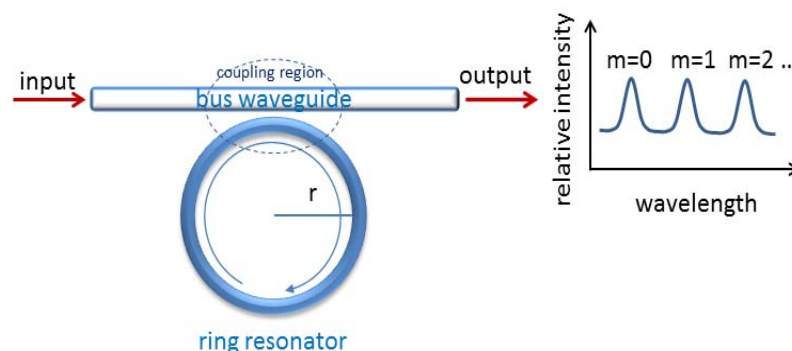
Οι πιο σημαντικοί οπτικοί ανοσοαισθητήρες για την ανίχνευση αναλυτών χωρίς τη χρήση ιχνηθετών είναι: οι αιωρούμενοι μικροδοκοί, οι συζευκτές φάσματος-πρίσματος, οι ελλειψομετρικοί βιοαισθητήρες, οι αισθητήρες που βασίζονται στη φασματοσκοπία ανακλαστικής συμβολής, οι αισθητήρες φωτονικών κρυστάλλων, οι ταλαντωτές μικροκοιλοτήτων-δακτυλοειδείς ταλαντωτές, οι αισθητήρες που βασίζονται στο συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων (SPR) και οι συμβολομετρικοί αισθητήρες. Στη συνέχεια θα αναλυθούν περαιτέρω οι τρεις τελευταίοι αισθητήρες με ιδιαίτερη έμφαση στους συμβολομετρικούς οι οποίοι αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας διατριβής.

4.5.2.1 Δακτυλοειδείς ταλαντωτές

Οι μικροδακτυλοειδείς ταλαντωτές αποτελούν μία ευρέως διαδεδομένη κατηγορία οπτικών αισθητήρων λόγω της υψηλής ευαισθησίας ανίχνευσης και της ικανότητας για ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλαπλών αναλυτών. Αποτελούνται από ένα δακτυλοειδή κυματοδηγό ο οποίος βρίσκεται σε μικρή απόσταση από ένα ευθύγραμμο κυματοδηγό (Εικόνα 11). Το φως συζευγνύεται μέσω φθίνοντος πεδίου από έναν ευθύγραμμο κυματοδηγό και στη συνέχεια μέσω συντονισμού στον δακτυλοειδή κυματοδηγό μέσω του οποίου διαδίδεται με τη μορφή *whispering-gallery modes*. Το φάσμα αυτών των ρυθμών επηρεάζεται από αλλαγές στο δείκτη διάθλασης στην εγγύτητα του δακτυλίου και ο συντονισμός λαμβάνει χώρα σε μήκος κύματος σύμφωνα με την εξίσωση $\lambda = 2\pi n_{\text{eff}} r / m$ όπου m

είναι ο ακέραιος που περιγράφει τους whispering-gallery modes angular momentum, r η ακτίνα του δακτυλίου και n_{eff} the effective δείκτης διάθλασης. Ο συντονισμός λαμβάνει χώρα για τα μήκη κύματος τα οποία είναι στην ίδια φάση μετά την εκτέλεση ενός κύκλου γύρω από το δακτύλιο και το φάσμα που λαμβάνεται στην έξοδο του ευθύγραμμου κυματοδηγού χαρακτηρίζεται από μέγιστα και ελάχιστα. Κατά την βιοαντίδραση, η πρόσδεση των μορίων κατά μήκος της επιφάνειας του μικροδακτυλίου έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του δείκτη διάθλασης του υπερκείμενου στρώματος με αποτέλεσμα τη μετατόπιση των φάσματος συμβολής προς την ερυθρά περιοχή του φάσματος (μεγαλύτερα μήκη κύματος). Αυτή η μετατόπιση παρακολουθείται είτε σαρώνοντας το φάσμα εξόδου ή μετρώντας την ένταση του φωτός σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος.

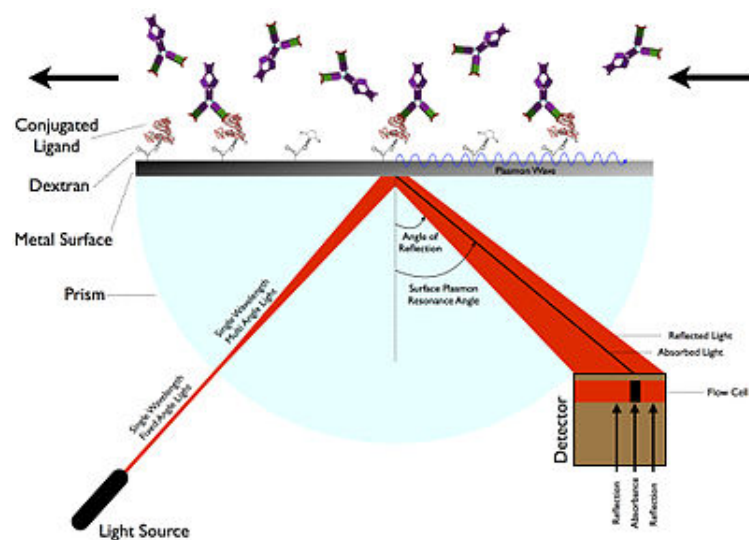
Οι μικροδακτυλιοειδείς ταλαντωτές που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα αποτελούνται από γυαλί, $\text{Si}_x\text{N}_y\text{-SiO}_2$, ή πολυμερή και έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πρωτεϊνών, DNA αλλά και βακτηρίων [192], ενώ έχουν αναπτυχθεί και μικροδακτυλιοειδείς ταλαντωτές που βασίζονται σε silicon-on-insulator (SOI) [193]. Ενδεικτικά, έχει πραγματοποιηθεί ανοσοχημική ανίχνευση καρκινοεμβρικού αντιγόνου (CEA) σε όρο με όριο ανίχνευσης τα 25 ng/mL mRNA, όπως και ταυτόχρονη ανίχνευση πέντε πρωτεϊνών, της α -φετοπρωτεΐνης (AFP), του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA), του παράγοντα νέκρωσης α (TNF- α), του CEA και της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) με όρια ανίχνευσης στην νανοκλίμακα [194,195]. Παρόλα αυτά, δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η εφαρμογή μικροδακτυλιοειδών ταλαντωτών για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων σε τρόφιμα.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση διάταξης μικροδακτυλιοειδούς ταλαντωτή

4.5.2.2 Ανοσοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων

Οι ανοσοαισθητήρες αυτής της κατηγορίας (Εικόνα 12) βασίζονται στη διέγερση πλασμονίων (επιφανειακών ηλεκτρονίων) ενός μεταλλικού φιλμ από Au ή Ag πάχους 50 nm. Όταν τα πλασμόνια διεγερθούν από εξωτερικά προσπίπτον φως ταλαντώνονται και δημιουργούν ένα κύμα ηλεκτρονικής πυκνότητας (κύμα πλασμονίων) το οποίο διαδίδεται κατά μήκος της επιφάνειας του μεταλλικού φιλμ και του διηλεκτρικού στρώματος, όπου είναι ακινητοποιημένα τα κατάλληλα βιοδραστικά μόρια [196]. Το κύμα πλασμονίων δημιουργεί ένα φθίνον κύμα το οποίο εισέρχεται στο διηλεκτρικό στρώμα και αλληλεπιδρά με τα ακινητοποιημένα βιοδραστικά μόρια. Η δέσμευση του αναλύτη από τα ακινητοποιημένα βιοδραστικά μόρια μεταβάλλει το δείκτη διάθλασης του διηλεκτρικού στρώματος μεταβάλλοντας ταυτόχρονα και τα χαρακτηριστικά του κύματος πλασμονίων. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να επιτευχθεί εκ νέου συντονισμός των πλασμονίων (μέγιστο απορρόφησης) είναι αναγκαίο να μεταβληθούν τα χαρακτηριστικά της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που αλληλεπιδρά με τα πλασμόνια. Έτσι μπορεί να μεταβληθεί η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας ενώ διατηρείται σταθερό το μήκος κύματος, το μήκος κύματος της ακτινοβολίας ενώ διατηρείται σταθερή η γωνία πρόσπτωσης, η φάση ή η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας διατηρώντας σταθερά και το μήκος κύματος και τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας καθώς επίσης το μέγεθος και τη φάση της μαγνητικής συνιστώσας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση αισθητήρα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων όπου η ανίχνευση πραγματοποιείται βάσει της γωνίας πρόσπτωσης για τη διέγερση των πλασμονίων

Για τη διέγερση των πλασμονίων είναι απαραίτητη η χρήση ενός οπτικού πρίσματος προκειμένου να καθοδηγηθεί η οπτική δέσμη στη μεσεπιφάνεια του μετάλλου και του διηλεκτρικού στρώματος. Χωρίς τη χρήση πρίσματος η διέγερση των πλασμονίων θα ήταν ανεπαρκής λόγω του ότι η σταθερά διάδοσης του κύματος πλασμονίων είναι πολύ μεγαλύτερη από τη σταθερά διάδοσης του φωτός σε περίπτωση απευθείας ακτινοβολήσης της μεταλλικής επιφάνειας [197,198]. Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί διατάξεις όπου αντί για πρίσμα χρησιμοποιείται οπτική ίνα ή οπτικός κυματοδηγός. Στην περίπτωση αυτή για την καθοδήγηση της οπτικής δέσμης πρέπει να ενσωματωθεί ανάμεσα στον οπτικό κυματοδηγό ή την ίνα ένα στρώμα χαμηλού δείκτη διάθλασης. Διατάξεις αυτού του είδους παρουσιάζουν δυνατότητα σμίκρυνσης συγκριτικά με την ογκώδη οργανολογία που έχουν οι αισθητήρες που βασίζονται σε πρίσμα [199,200].

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει ιδιαίτερη ανάπτυξη η απεικόνιση SPR, ISPR (Imaging SPR), το σύστημα της οποίας περιλαμβάνει μία συμφασική πηγή φωτός πολωμένη κατά p . Η δέσμη αυτής της πηγής διευρύνεται και ανακλάται στον ανιχνευτή όπου μία κάμερα CCD (Charged-coupled source) συλλέγει την ένταση του ανακλώμενου φωτός και την αναπαριστά σε μία εικόνα [201].

Μία άλλη ενδιαφέρουσα παραλλαγή του SPR είναι το εντοπισμένο SPR, LSPR (Localized SPR). Στην τεχνική αυτή ένα οπτικό πεδίο προσπίπτει πάνω σε μεταλλικά νανοσωματίδια όπου πραγματοποιείται απορρόφηση όταν η οπτική συχνότητα συντονίζεται με συχνότητα των ηλεκτρονίων αγωγιμότητας [202].

Οι ανοσοαισθητήρες που βασίζονται στον συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων παρέχουν υψηλής ευαισθησίας ανίχνευση χωρίς τη χρήση ιχνηθετών καθώς επίσης και δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στον τομέα της βιοϊατρικής, του περιβάλλοντος και των τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα έχουν αναπτυχθεί αρκετοί αισθητήρες βασιζόμενοι στο φαινόμενο SPR για τον προσδιορισμό είτε μεμονωμένων είτε πολλαπλών αλλεργιογόνων στο ίδιο δείγμα.

Στους αισθητήρες μονού αναλύτη που αναφέρονται στα σχετικά με τη μελέτη αλλεργιογόνα, περιλαμβάνεται μέθοδος που αναπτύχθηκε με τη συσκευή Biacore 3000 για τον προσδιορισμό βοείου β -καζεΐνης σε γάλα και τυρί. Η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 10 min και το όριο ευαισθησίας 85 ng/mL [203]. Πρόσφατα, αναπτύχθηκε μέθοδος ανοσοπροσδιορισμού α -καζεΐνης ως δείκτη για την ανίχνευση γάλακτος σε νερό έκπλυσης σωληνώσεων από βιομηχανίες τροφίμων χρησιμοποιώντας τη συσκευή Sierra Sensor SPR2/4. Το όριο ανίχνευσης σε αυτή

την περίπτωση ήταν 58 ng/mL ενώ ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ανάλυση ήταν 3 min [204]. Σε μια άλλη εργασία αναπτύχθηκε ανοσοαισθητήρας για τον προσδιορισμό Ara h 1 σε σακχαρόπηκτα σοκολάτας χρησιμοποιώντας πρωτότυπη διάταξη ανίχνευσης μέσω SPR βασιζόμενη σε επιχρυσωμένη οπτική ίνα. Το όριο ανίχνευσης ήταν 90 ng/mL ενώ ο χρόνος της ανάλυσης 20 min [205]. Το 2003 αναπτύχθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό βοείου κ-καζεΐνης σε αγελαδινό γάλα με όριο ανίχνευσης 0,45 µg/mL σε 10 min [206]. Επίσης, το 2007 παρουσιάστηκε μέθοδος βασιζόμενη στην αρχή του LSPR για την ανίχνευση καζεΐνης σε γάλα με όριο ανίχνευσης 10 ng/mL [207]. Δύο ενδιαφέρουσες εφαρμογές για τον προσδιορισμό νοθείας κασικίσιου και πρόβειου γάλακτος με αγελαδινό γάλα αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Ο προσδιορισμός του αγελαδινού γάλακτος και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε σε λιγότερο από 10 min και είχε όριο ανίχνευσης <0,2% (o/o) [208,209].

Με στόχο την μείωση του χρόνου και του κόστους ανάλυσης η ανάπτυξη αισθητήρων SPR εστιάστηκε επίσης στην ανίχνευση περισσότερων του ενός αλλεργιογόνων στο ίδιο δείγμα. Προς αυτή την κατεύθυνση, αναπτύχθηκε με χρήση της συσκευής Biacore 3000 ανοσοαισθητήρας για την ταυτόχρονη ανίχνευση πρωτεΐνης σόγιας, πρωτεΐνης φυστικιού και γλουτένης σε σκόνη γάλακτος. Το όριο ανίχνευσης και για τους τρεις αναλύτες ήταν χαμηλότερο του 0,1% κ.β. και ο χρόνος της ανάλυσης 5 min [210]. Πιο πρόσφατα, χρησιμοποιώντας την τεχνική iSPR αναπτύχθηκε αισθητήρας για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δεκατριών αλλεργιογόνων σε μπισκότα και σοκολάτα υγείας, περιλαμβανομένων των πρωτεϊνών σόγιας, φυστικιού και αγελαδινού γάλακτος. Ο χρόνος ανάλυσης ήταν 7 min για όλες τις ουσίες. Ωστόσο, τα όρια ανίχνευσης που επετεύχθησαν με αυτή τη μέθοδο ήταν σχετικά υψηλά σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεθόδους που βασίζονται στην τεχνική SPR. Συγκεκριμένα, για την πρωτεΐνη φυστικιού ήταν 3.2 mg/g και για την κ-καζεΐνη 0,2 µg/g. Επιπλέον, η ανίχνευση της πρωτεΐνης σόγιας αξιολογήθηκε μόνο σε ρυθμιστικό διάλυμα ενώ το όριο ανίχνευσής της ήταν 5 mg/g [211].

4.5.2.3 Συμβολομετρικοί αισθητήρες

Η οπτική συμβολομετρία είναι μία μέθοδος που στηρίζεται στη σύγκριση των διαφορών που δημιουργούνται από δύο δέσμες φωτός που διαδίδονται κατά μήκος παρόμοιων οπτικών διαδρομών και συμβάλλουν μετά από μία απόσταση. Για την αξιοποίηση της συμβολομετρίας στους βιοαισθητήρες που βασίζονται στην αρχή των δεσμευτικών αναλύσεων, η βιοαντίδραση πραγματοποιείται σε μία από

τις δύο δέσμες προκαλώντας μεταβολές στο μήκος κύματος ή στην ταχύτητα διάδοσης του φωτός. Η μεταβολή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη τροποποίηση της φάσης φ του φωτός η οποία εξαρτάται από το μήκος διάδοσης L , τον δείκτη διάθλασης n και το μήκος κύματος λ σύμφωνα με την εξίσωση $\varphi=2\pi L n/\lambda$ [212].

Στους ανοσοαισθητήρες η παράμετρος που χρησιμοποιείται για παρακολούθηση των αντιδράσεων είναι η μεταβολή του δείκτη διάθλασης του υλικού στο οποίο δημιουργούνται τα ανοσοσυμπλέγματα. Η φάση οπτικής δέσμης που αλληλεπιδρά με αυτό το υλικό (αισθητήρια δέσμη) μεταβάλλεται σε σχέση με εκείνη κοντινής οπτικής δέσμης που δεν αλληλεπιδρά με αυτό (δέσμη αναφοράς) οπότε όταν οι δύο δέσμες συμβάλλουν δημιουργείται φάσμα συμβολής αποτελούμενο από εναλλασσόμενους φωτεινούς και σκοτεινούς κροσσούς το οποίο μετατοπίζεται λόγω μεταβολής του δείκτη διάθλασης του υλικού που αλληλεπιδρά με την αισθητήρια δέσμη (ημιτονοειδές σήμα στην έξοδο).

Παρόλο που η συμβολομετρία ως τεχνική ξεκίνησε το 1803 με τα πειράματα του Thomas Young [213], που ήταν καθοριστικά για την απόδειξη της κυματικής φύσης του φωτός, η χρήση αυτής της τεχνικής για εφαρμογές σε αισθητήρες ξεκίνησε το 1983. Οι Lukosz και Tiefenthaler εργαζόμενοι με συζεύκτες φράγματος για επίπεδους κυματοδηγούς παρατήρησαν ότι οι μεταβολές της υγρασίας επηρέαζαν τις γωνίες και τις αποδόσεις σύζευξης λόγω της αλληλεπίδρασης των ατμών του νερού με τα φθίνοντα πεδία των κυματοδηγών. Οι παρατηρήσεις τους αξιοποιήθηκαν για την παρακολούθηση μεταβολών αερίων και υγρασίας καθώς και βιοαντιδράσεων με διατάξεις συζευκτών φράγματος και με συμβολομετρικούς αισθητήρες επίπεδων οπτικών κυματοδηγών.

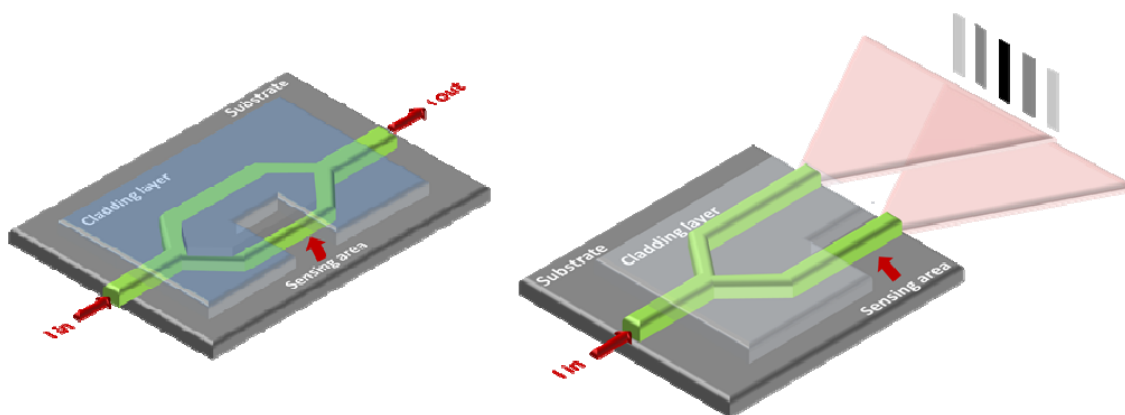
Ένας συμβολομετρικός βιοαισθητήρας αποτελείται από μία πηγή φωτός, τον κυματοδηγό και τον ανιχνευτή. Οι κυματοδηγοί αποτελούν το βασικότερο τμήμα ενός συμβολομετρικού βιοαισθητήρα καθώς μέσω αυτών πραγματοποιείται η διάδοση του φωτός και επιπλέον αποτελούν το υπόστρωμα για την πραγματοποίηση των βιομοριακών αντιδράσεων. Οι επίπεδοι κυματοδηγοί λειτουργούν παρεμφερώς με τις οπτικές ίνες [214], δηλαδή κατασκευάζονται από υλικό υψηλού δείκτη διάθλασης που επιστρώνεται σε υπόστρωμα χαμηλού δείκτη διάθλασης ώστε το φως να διαδίδεται κατά μήκος του κυματοδηγού μέσω ολικής εσωτερικής ανάκλασης. Η κυματοδηγούμενη δέσμη δημιουργεί ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που εκτείνεται εκτός της επιφάνειας του κυματοδηγού και αλληλεπιδρά με το υπερκείμενο μέσο. Αυτή η αλληλεπίδραση αξιοποιείται για την παρακολούθηση μεταβολών του δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του κυματοδηγού.

Οι επίπεδοι κυματοδηγοί υπερτερούν έναντι των οπτικών ινών για χρήση σε συμβολομετρικούς βιοαισθητήρες λόγω του ότι επιτρέπουν την προσθήκη και άλλων οπτικών στοιχείων στο ίδιο υπόστρωμα ή εντός του κυματοδηγού [215]. Η σύζευξη του φωτός στον κυματοδηγό πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση φραγμάτων ενώ η επιθυμητή κατεύθυνση της δέσμης επιτυγχάνεται με χρήση καθρεπτών, διαχωριστών δεσμών ή διαμορφωτών. Η απόκριση ενός επίπεδου κυματοδηγού και κατ' επέκταση η ευαισθησία ανίχνευσης φυσικοχημικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του, π.χ., ακινητοποίηση αντισωμάτων, δέσμευση αντιγόνων στο ακινητοποιημένο αντίσωμα, καθορίζεται από το δείκτη διάθλασης, το πάχος του κυματοδηγού, καθώς και το μήκος του κυματοδηγού που αλληλεπιδρά με το υλικό στο οποίο συμβαίνουν οι φυσικοχημικές μεταβολές. Όσο μεγαλύτερο το μήκος του κυματοδηγού τόσο μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία ανίχνευσης που προσφέρει. Επιπρόσθετα, η ευαισθησία ανίχνευσης εξαρτάται από το δείκτη διάθλασης του υποστρώματος ο οποίος συνεισφέρει στην ένταση του φθίνοντος πεδίου και αυξάνεται όσο αυξάνεται η διαφορά μεταξύ του δείκτη διάθλασης του κυματοδηγού με εκείνον του υποστρώματος. Ωστόσο, το όριο ανίχνευσης που είναι δυνατόν να επιτευχθεί μέσω της αύξησης του μήκους του κυματοδηγού όσο και της διαφοράς του δείκτη διάθλασης του κυματοδηγού με το υπόστρωμα περιορίζεται από το θερμικό και μηχανικό θόρυβο του κυματοδηγού, τη σταθερότητα της δέσμης του φωτός καθώς και από τα χαρακτηριστικά του ανιχνευτή. Έτσι, τα τυπικά όρια ανίχνευσης που επιτυγχάνονται με κατάλληλο σχεδιασμό του κλάδου αναφοράς είναι της τάξεως του 10^{-6} RIU (Refractive Index Units). Ο κατάλληλος σχεδιασμός του βραχίονα αναφοράς είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την ευαισθησία ανίχνευσης εφόσον η συμβολομετρία βασίζεται στην καταγραφή των διαφορών του κυματοδηγούμενου φωτός μεταξύ του αισθητηρίου βραχίονα και του βραχίονα αναφοράς. Για το λόγο αυτό, τόσο η δομή όσο και η απόκριση του βραχίονα αναφοράς πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο όμοια με εκείνη του αισθητηρίου βραχίονα καθώς επίσης και η μεταξύ τους απόσταση όσο το δυνατόν μικρότερη ώστε να εξουδετερώνονται πιθανές μικρές διακυμάνσεις που οφείλονται σε θερμικούς και μηχανικούς παράγοντες.

Συμβολόμετρα

Τα συμβολόμετρα επίπεδων κυματοδηγών κατατάσσονται ανάλογα με τη διαμόρφωση τους σε διαφορετικές κατηγορίες όπως συμβολόμετρα Mach-Zehnder, Young, Hartman, διπλής πόλωσης, διρρυθμικών κυματοδηγών, κλπ. ή με γενικότερους όρους σε συμβολόμετρα μονής και διπλής διαδρομής.

Οι συνηθέστερες διαμορφώσεις συμβολομέτρων διπλής διαδρομής, τα οποία είναι τα πλέον χρησιμοποιούμενα στους βιοαισθητήρες, είναι τα συμβολόμετρα Mach-Zehnder και τα συμβολόμετρα Young (Εικόνα 13). Ένα συμβολόμετρο Mach-Zehnder αποτελείται από έναν επίπεδο κυματοδηγό μονού ρυθμού ο οποίος σε κάποιο σημείο της διαδρομής του διαχωρίζεται μέσω ενός διαιρέτη Y σε δύο βραχίονες, τον αισθητήριο βραχίονα και το βραχίονα αναφοράς, ενώ μετά από ορισμένη απόσταση ένας δεύτερος διαιρέτης Y συνενώνει εκ νέου τους δύο βραχίονες. Ο κυματοδηγός καλύπτεται από προστατευτικό κάλυμμα (cladding layer) διηλεκτρικού, με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης σε σχέση με εκείνον του κυματοδηγού, εκτός από μία περιοχή του αισθητήριου βραχίονα όπου οι κυματοδηγούμενοι ρυθμοί αλληλεπιδρούν με το δείγμα. Στα υβριδικά συμβολόμετρα Mach-Zehnder, τα οποία είναι μερικώς ολοκληρωμένα στο υπόστρωμα, ο διαχωρισμός και η επανένωση των οπτικών δεσμών πραγματοποιούνται εκτός του υποστρώματος όπου ολοκληρώνονται οι δύο βραχίονες με χρήση συνήθων οπτικών εξαρτημάτων. Στα ολοκληρωμένα σε υπόστρωμα συμβολόμετρα Mach-Zehnder η σύζευξη του φωτός στον κυματοδηγό καθώς και η συλλογή του εξερχομένου από αυτόν φωτός επιτυγχάνεται με χρήση συζευκτών φράγματος. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αισθητήρες βασισμένοι σε συμβολόμετρα Mach-Zehnder οι οποίοι είχαν τη δυνατότητα ανίχνευσης στρεπταβιδίνης με όριο ανίχνευσης 18,9 fM [216], καθώς επίσης *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* σε συγκεντρώσεις 10^5 και 10^6 cfu/mL, αντίστοιχα [217,218].

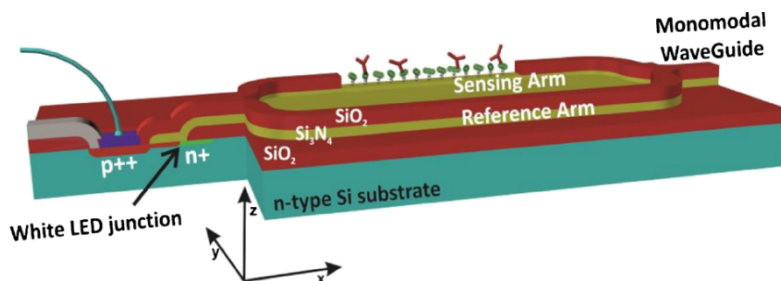


Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού συμβολομέτρου Mach-Zehnder (αριστερά) και ενός Young (δεξιά).

Μία παραλλαγή του συμβολομέτρου Mach-Zehnder είναι το συμβολόμετρο Young (Εικόνα 14) το οποίο απαιτεί απλούστερα ηλεκτρονικά ανάγνωσης και είναι λιγότερο ευαίσθητο σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και του μήκους κύματος. Η διαφορά του έγκειται στο ότι οι δύο βραχίονες δεν συνενώνονται αλλά το εξερχόμενο από αυτούς φως συμβάλλει εκτός του κυματοδηγού ενώ το μοτίβο συμβολής που δημιουργείται καταγράφεται με αισθητήρα εικόνας. Η διαφορά φάσης μεταξύ των δύο κυματοδηγούμενων οπτικών δεσμών που οφείλεται σε μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του αισθητηρίου βραχίονα οδηγεί σε μετατόπιση του μοτίβου συμβολής η οποία αποτελεί και το αναλυτικό σήμα. Το όριο ανίχνευσης ως προς τον ενεργό δείκτη διάθλασης που έχει επιτευχθεί με τέτοιου είδους συμβολόμετρα είναι της τάξεως του $8,5-9 \times 10^{-8}$ RIU. Συμβολόμετρα Young έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση πρωτεϊνών, φαρμακευτικών ουσιών [219], και απλού ερπητοϊού τύπου 1 σε ορό [220,221] καθώς και ειδικών αντισωμάτων κατά του βακίλου φυματίωσης σε δείγματα ασθενών [222].

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα αξιολογηθεί οπτικός ανοσοαισθητήρας ολοκληρωμένος σε ψηφίδες πυριτίου ο οποίος βασίζεται στη συμβολομετρία Mach-Zehnder και δεν απαιτεί τη χρήση ιχνηθετημένων μορίων για την παρακολούθηση βιομοριακών αντιδράσεων. Ο συγκεκριμένος οπτοηλεκτρονικός αισθητήρας κατασκευάζεται εξ' ολοκλήρου με τεχνολογία ολοκληρωμένων κυκλωμάτων από τον τομέα Μικροηλεκτρονικής του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» και συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των συμβολομέτρων Mach-Zehnder με αυτά των ολοκληρωμένων στο πυρίτιο οπτικών αισθητήρων (Εικόνα 14) [223,224]. Κάθε ψηφίδα περιλαμβάνει συστοιχία δέκα αισθητήρων κάθε ένας εκ των οποίων αποτελείται από ολοκληρωμένη στην ψηφίδα πυριτίου πηγή φωτός ευρέως φάσματος (ορατό - εγγύς υπέρυθρο) οπτικά συζευγμένη με έναν επίσης ολοκληρωμένο στην ψηφίδα κυματοδηγό νιτριδίου του πυριτίου σχηματισμένο σε συμβολόμετρο Mach-Zehnder. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του αισθητήρα, σε σύγκριση με άλλους της βιβλιογραφίας είναι η ολοκλήρωση πολλαπλών αισθητήρων στην ίδια ψηφίδα πυριτίου, γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού πολλαπλών αναλυτών στο ίδιο δείγμα μέσω βιοενεργοποίησης των διαφορετικών κυματοδηγών με διαφορετικά βιομόρια αναγνώρισης [225]. Η αρχή λειτουργίας των οπτικών αισθητήρων της ψηφίδας αποτελεί πρόσφατη εξέλιξη της Συμβολομετρίας Mach-Zehnder, την επονομαζόμενη Συμβολομετρία Mach-Zehnder Ευρέως Φάσματος Διπλής Πόλωσης (ΣΜΖ-ΔΠ). Η ΣΜΖ-ΔΠ εκμεταλλευόμενη το ευρύ φάσμα εκπομπής των ολοκληρωμένων πηγών φωτός της ψηφίδας, αλλά και τις δύο πολώσεις του εισερχομένου φωτός (TE και TM),

ξεπερνά τους εγγενείς περιορισμούς της «κλασσικής» μονοχρωματικής συμβολομετρίας μονής πόλωσης, γνωστούς ως signal fading και phase ambiguity -που περιορίζουν την σαφήνεια και ακρίβεια των μετρήσεων και οδηγούν πολλές φορές σε πολύσημα αποτελέσματα [226,227].



Εικόνα 14: Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός μονολιθικά ολοκληρωμένου σε ψηφίδα πυριτίου συμβολομέτρου Mach-Zehnder.

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης, το φάσμα συμβολής κάθε κυματοδηγού καταγράφεται συνεχώς μέσω εξωτερικού φασματοφωτομέτρου και μετά από κατάλληλη μαθηματική επεξεργασία (Διακριτός μετασχηματισμός Fourier) η μεταβολή του φάσματος, που οφείλεται στην αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του αισθητήριου βραχίονα, μετατρέπεται σε μεταβολή της φάσης του κυματοδηγουμένου φωτός [225]. Ο αισθητήρας έχει ήδη αξιολογηθεί ως προς την ευαισθησία ανίχνευσης σε επίπεδο δείκτη διάθλασης και έχει βρεθεί ότι μπορεί να ανιχνεύει μεταβολές του δείκτη διάθλασης $\sim 5 \times 10^{-7}$ RIU. Επίσης, έχει μελετηθεί η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών βιομοριακών αντιδράσεων με χρήση δεσμευτικών αντιδράσεων μοντέλων και συγκεκριμένα της αντίδρασης βιοτίνης/στρεπταβιδίνης και γ-σφαιρινών ποντικού/αντισώματα έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού. Τα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν ήταν 5 pM για τη στρεπταβιδίνη και 32 pM για το αντίσωμα έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού. Βάσει αυτών, ο αισθητήρας που θα χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είναι από τους πλέον ευαίσθητους για την ανίχνευση αναλυτών χωρίς τη χρήση ιχνηθετών στη διεθνή βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, θα αναπτυχθεί αισθητήρας για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αλλεργιογόνων (κ-καζεΐνη, πρωτεΐνη φιστικιού, πρωτεΐνη σόγιας, γλιαδίνη) σε νερό έκπλυσης από το τελικό στάδιο του καθαρισμού σωληνώσεων βιομηχανίας τροφίμων. Επιπλέον, ο εν λόγω οπτικός ανοσοαισθητήρας θα αξιολογηθεί για τον προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η τροφική αλλεργία αποτελεί σοβαρό ζήτημα υγείας καθώς επηρεάζει το 3-5% των ενηλίκων και 8% των παιδιών παγκοσμίως. Όπως προαναφέρθηκε, ο μόνος τρόπος αντιμετώπισής της είναι η αυστηρή αποφυγή κατανάλωσης τροφίμων που μπορεί να εμπεριέχουν αλλεργιογόνες ουσίες από άτομα με αλλεργική προδιάθεση. Δεδομένου ότι η κατώτερη ποσότητα αλλεργιογόνου που μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση σε έναν οργανισμό με υπερευαισθησία στη συγκεκριμένη ουσία δεν είναι καθορισμένη, τόσο ο FDA όσο και η Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν θεσπίσει κανόνες και κατευθυντήριες οδηγίες που επιβάλλουν τον έλεγχο των προϊόντων και την αναγραφή της ύπαρξης αλλεργιογόνων ουσιών στην ετικέτα των συσκευασμένων τροφίμων με στόχο να προστατεύσουν τους ευπαθείς καταναλωτές. Ωστόσο, παρά τα μέτρα που λαμβάνονται και τους ελέγχους που πραγματοποιούνται από τις βιομηχανίες τροφίμων, λόγω του ότι στις ίδιες εγκαταστάσεις και σε κοινές γραμμές παραγωγής παράγονται διαφορετικά είδη προϊόντων, μπορεί να προκύψει τυχαία επιμόλυνση σε διάφορα στάδια της παραγωγής. Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος της παρουσίας αλλεργιογόνων μετά το στάδιο του καθαρισμού των γραμμών παραγωγής μίας βιομηχανίας τροφίμων θεωρείται ένα από τα κρίσιμότερα στάδια ελέγχου.

Οι μέθοδοι που συνήθως χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο αλλεργιογόνων ουσιών σε δείγματα τροφίμων ή δείγματα από τις βιομηχανικές εγκαταστάσεις είναι οι ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί και η ανάλυση DNA. Τα κύρια μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι όσον αφορά τις ανοσοχημικές ότι προσδιορίζουν συνήθως έναν μόνο αναλύτη, και για τις μεθόδους DNA ότι δεν υπάρχει συσχέτιση της ποσότητας του DNA και της ποσότητας της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης που βρίσκεται σε ένα τρόφιμο. Επιπλέον, και οι δύο μέθοδοι προϋποθέτουν ογκώδη οργανολογία και είναι χρονοβόρες. Η παγκοσμιοποίηση της αγοράς τροφίμων και πρώτων υλών για την παραγωγή τους δημιουργεί ιδιαίτερα αυξημένη ανάγκη ελέγχων και έχει ωθήσει στην ανάπτυξη συστημάτων για την ταχεία και επιτόπια ανάλυση αλλεργιογόνων. Προς αυτήν την κατεύθυνση, η ανάπτυξη βιοαισθητήρων που παρέχουν τη δυνατότητα ταχείας και αξιόπιστης ανάλυσης μίας ή περισσότερων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στο ίδιο δείγμα αναμένεται να παίξει καθοριστικό ρόλο.

Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη ανοσοαισθητήρα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αλλεργιογόνων σε νερό έκπλυσης σωληνώσεων βιομηχανιών τροφίμων. Για την ανάπτυξη του ανοσοαισθητήρα επιλέχθηκε να αξιοποιηθεί οπτοηλεκτρονική ψηφίδα πυριτίου, η οποία έχει αναπτυχθεί από το εργαστήριο Οπτικών Βιοαισθητήρων του Ι.Ν.Ν. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων-Ανοσοαισθητήρων του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. λόγω α) της υψηλής ευαισθησίας ανίχνευσης χωρίς τη χρήση ιχνηθετών, β) της δυνατότητας ταυτόχρονης ανίχνευσης αναλυτών στο ίδιο δείγμα και γ) των υψηλών δυνατοτήτων της σμίκρυνσης που παρέχει, όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 4.5.2.3. Στην ψηφίδα ολοκληρώνονται μονολιθικά δέκα συμβολόμετρα Mach-Zehnder με τις αντίστοιχες πηγές φωτός, ενώ η καταγραφή του φάσματος συμβολής σε πραγματικό χρόνο πραγματοποιείται από εξωτερικό φασματοφωτόμετρο. Μέσω βιολογικής ενεργοποίησης των διαφορετικών συμβολομέτρων με διαφορετικό αλλεργιογόνο παρέχεται η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσής τους στο ίδιο δείγμα.

Ο οπτικός ανοσοαισθητήρας που αναπτύχθηκε στόχευε την ταυτόχρονη ανίχνευση της κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης σε νερά έκπλυσης σωληνώσεων βιομηχανιών τροφίμων. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, κατ' αρχήν επιλέχθηκαν πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα και αναπτύχθηκαν ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Ακολούθως τα πρωτόκολλα μεταφέρθηκαν στον οπτικό ανοσοαισθητήρα όπου βελτιστοποιήθηκαν εκ νέου όλες οι παράμετροι των ανοσοχημικών προσδιορισμών για καθέναν από τους αναλύτες καθώς και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους (π.χ. συγκέντρωση ακινητοποιημένης πρωτεΐνης, συγκέντρωση αντισωμάτων, σύσταση διαλυμάτων ανοσοαντίδρασης, χρόνος προεπάσης αντισωμάτων-προτύπων διαλυμάτων, χρόνος ανοσοαντίδρασης, ροή αντιδραστηρίων, κ.α.). Επιπλέον δοκιμάστηκαν μικρορευστομηχανικές κυψελίδες διαφορετικής διαμόρφωσης για την τροφοδοσία των αντιδραστηρίων στην ψηφίδα προκειμένου να επιλεγεί εκείνη με την οποία λαμβάνεται το υψηλότερο σήμα στο συντομότερο δυνατό χρόνο και καλή επαναληψιμότητα των των μετρήσεων. Οι αισθητήρες αξιολογήθηκαν ως προς τα αναλυτικά τους χαρακτηριστικά με δείγματα νερού έκπλυσης από το τελικό στάδιο καθαρισμού σωληνώσεων βιομηχανίας τροφίμων. Λόγω των ιδιαίτερα καλών αποτελεσμάτων που ελήφθησαν, ο αισθητήρας αξιοποιήθηκε επιπλέον στα πλαίσια της παρούσας διατριβής για την ανίχνευση νοθείας κασικίσιου γάλακτος με αγελαδινό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 ΥΛΙΚΑ

- Ώξινο ανθρακικό νάτριο, NaHCO_3 , (Merck, Germany).
- Ανθρακικό νάτριο, Na_2CO_3 , (Merck, Germany).
- Χλωριούχο νάτριο, NaCl , (Sigma, USA).
- Νατραζίδιο, NaN_3 , (Merck, Germany).
- Τρις(υδροξυ-μεθυλο)-αμινο-μεθάνιο, (Merck, Germany).
- Αιθυλο-υδραργυρο-θειο-σαλικυλικό οξύ σε μορφή άλατος με νάτριο (Thimerosal, Janssen Chimica, Belgium).
- Ένυδρο υπερβορικό νάτριο ($\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Germany).
- 2,2-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-)σουλφονικό οξύ, ABTS (Sigma, USA).
- Σουλφο-ηλεκτριμιδοεστέρας του 6[(βιοτινοϋλο)αμινο] εξανοϊκού οξέος (Sulfo-NHS-LC-biotin), (Molecular Probes, Eugene, Or, USA).
- Αλβουμίνη ορού βοός (BSA, RIA grade, Sigma, St. Louis, Mo, USA).
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο, DMSO, (CarloErba, Italy).
- Πυκνό θειικό οξύ, 95-97 % (v/v) (Merck, , Γερμανία)
- Υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% (o/o) (CarloErba, Ιταλία)
- 3-αμινο-προπυλο-τριαθοξυ-σιλάνιο (APTES), (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA).
- Δις απεσταγμένο νερό.
- Tween 20, (Merck, Germany).
- Διάλυμα ακινητοποίησης (ELISA): ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 0,05 M, pH 9,2.
- Διάλυμα αποκλεισμού ελεύθερων θέσεων δέσμησης του πλαστικού: διάλυμα όξινων ανθρακικών 0,1 M, pH 8,5, 1 % (β/o) BSA.
- Διάλυμα έκπλυσης 1 (ELISA): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7,4
- Διάλυμα έκπλυσης 2 (ELISA): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7,4 και 0,05% Tween 20.
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης (ELISA): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM, pH 7,4, με 1% (β/o) BSA, 0,9% (β/o) NaCl , 0,05% (o/o) Tween 20, 0,05% (β/o) NaN_3 .
- Διάλυμα αραίωσης δευτέρου αντισώματος (ELISA): ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,15 M, pH 8,25, 0,5% (β/o) BSA, 0,02% (β/o) thimerosal.

- Διάλυμα αντίδρασης με τη Streptavidin-HRP (ELISA): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,05 M, pH 6,5, με 0,9 % NaCl, 1% (β/ο) BSA, 0,02% (β/ο) Thimerosal.
- Διάλυμα υποστρώματος της υπεροξειδάσης (ELISA): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικών 0,05 M, pH 4,4 που περιέχει 3,2 mM $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ και 1,9 mM ABTS.
- Νερό δικτύου
- Αγελαδινό γάλα χαμηλής και υψηλής παστερίωσης ΔΕΛΤΑ και φρέσκο αγελαδινό γάλα από φάρμες της Αττικής
- Κατσικίσιο γάλα (ΟΛΥΜΠΟΣ, ΕΒΟΛ και φρέσκο κατσικίσιο γάλα)
- κ-καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος (Sigma- Aldrich Co., Darmstadt, Germany)
- Γλιαδίνη από σιτάρι (Sigma- Aldrich Co., Darmstadt, Germany)
- Εκχύλισμα ολικής πρωτεΐνης φιστικιού (παρασχέθηκαν στα πλαίσια υλοποίησης του Ευρωπαϊκού Προγράμματος FOODSNIFFER από το RIKILT WAGENINGEN, Ολλανδία).
- Εκχύλισμα ολικής πρωτεΐνης σόγιας (RIKILT- WAGENINGEN, Ολλανδία)
- Μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι της κ-καζεΐνης: 33-4G10 και 33-6A10, έναντι της πρωτεΐνης φιστικιού: 51-12D2, 51-5G9, 51-6A12, 44-4G2 και 44-8G7, έναντι της πρωτεΐνης σόγιας: 26-5G5 και 26-6C9 (παρασχέθηκαν στα πλαίσια υλοποίησης του Ευρωπαϊκού Προγράμματος FOODSNIFFER από το RIKILT WAGENINGEN, Ολλανδία).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της γλιαδίνης: G9144 (Sigma- Aldrich, Darmstadt, Germany).
- Αντίσωμα αιγός κατά των γ- σφαιρινών ποντικού συζευγμένο με υπεροξειδάση της ραπανίδος (Sigma- Aldrich, Darmstadt, Germany).
- Αντίσωμα αιγός κατά των γ- σφαιρινών κουνελιού συζευγμένο με υπεροξειδάση της ραπανίδος (Sigma- Aldrich, Darmstadt, Germany).
- Βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της κ- καζεΐνης: 33-4G10
- Σύζευγμα στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης της ραπανίδος (Str-HRP, Sigma, St. Louis, Mo, USA).
- Αντίσωμα αιγός κατά των γ- σφαιρινών ποντικού (Sigma- Aldrich, Darmstadt, Germany).
- Αντίσωμα αιγός κατά των γ- σφαιρινών κουνελιού (Sigma- Aldrich, Darmstadt, Germany).
- Διαφανή φρεάτια μικροπιλοδότσης πολυστυρενίου, (Greiner Bio- one, Γερμανία).

- Ψηφίδες πυριτίου-αισθητήρες (Si-Mat, Kaufering, Germany).
- Διάλυμα έκπλυσης των ακίδων μεταφοράς των βιομορίων: 1% (ο/ο) Triton X100 σε απεσταγμένο νερό.
- Διάλυμα έκπλυσης ψηφίδας: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης ψηφίδας: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4, 1% (β/ο) BSA.
- Διάλυμα αναγέννησης HCl 50 mM.
- Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων της ψηφίδας για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4, 1% (ο/ο) φρέσκο κατσικίσιο γάλα.

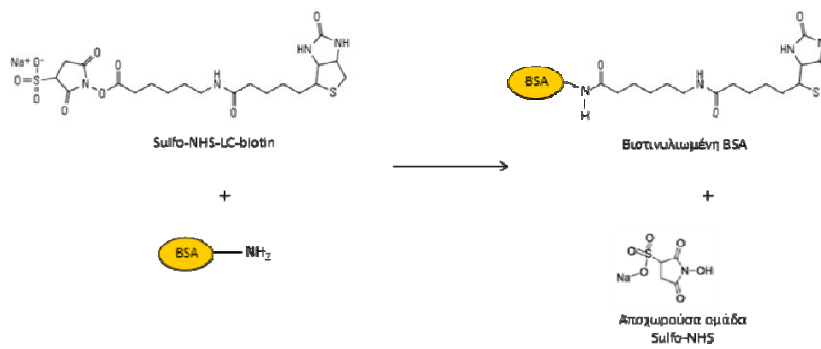
6.2 ΟΡΓΑΝΑ

- Μembrάνη διαπίδυσης (cut-off MW 12000 Sigma, St. Louis, Mo., USA).
- Πιπέττες Eppendorf σταθερού όγκου.
- Υάλινα τρυβλία.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι.
- Λουτρό υπερήχων, Elmasonic S 30 H, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Γερμανία.
- Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης, Victor³ Multilabel Readers (PerkinElmer, ΗΠΑ).
- pH-μετρο, model pH 127, Xenon, Ελλάδα.
- Αντιδραστήρας εγχάραξης με ενεργά ιόντα (NE330 parallel plate plasma reactor, Nextral, Γαλλία).
- Φούρνος, Heraus T6 (Thermon Electron, Germany).
- Συσκευή αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories Inc., ΗΠΑ).
- Μικρορευστομηχανική κυψελίδα (Jobst Technologies GmbH, Freiburg, Germany).
- Πειραματική διάταξη μετρήσεων.
- Περισταλτική αντλία (Peristaltic pump P1, Pharmacia Fine Chemicals Inc., Piscataway, New Jersey).

6.3 Παρασκευή συζευγμάτων πρωτεϊνών με βιοτίνη (βιοτινυλίωση)

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για τη βιοτινυλίωση των μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της κ- καζεΐνης και της αλβουμίνης ορού βοός, χρησιμοποιήθηκε το μετά νατρίου άλας του σουλφο-ηλεκτριμιδο εστέρα του 6-[(βιοτινούλο)αμινο]εξανοϊκού οξέος (Sulfo-NHS-LC-Biotin). Η σύνθεση των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνικών παραγώγων επιτυγχάνεται μέσω σχηματισμού αμιδικού δεσμού μεταξύ των ελεύθερων αμινομάδων των αντισωμάτων με την ενεργοποιημένη καρβοξυλομάδα του Sulfo-NHS-LC-Biotin, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15: Αντίδραση βιοτινυλίωσης πρωτεΐνης.

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Παρασκευάζεται διάλυμα Sulfo-NHS-LC-Biotin συγκέντρωσης 100 mg/mL, με διάλυση κατάλληλης ποσότητας σε DMSO. Έπειτα, προστίθεται ορισμένη ποσότητα από αυτό το διάλυμα σε διάλυμα αντισώματος/ αλβουμίνης ορού βοός συγκέντρωσης 1 mg/mL, σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών συγκέντρωσης 0,25 M, pH 9,2, στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση, ώστε η τελική κατά βάρος αναλογία sulfo-NHS-LC-biotin/αντισώματος ή αλβουμίνης ορού βοός να είναι 1,5:1. Ακολουθεί επώαση του μίγματος επί 2 h στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου, υπό έντονη ανάδευση του μίγματος ανά 15 min. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης (12000 MW cut-off), και διαπιδύεται έναντι 4 L διαλύματος ανθρακικών 0,1 M, pH 8,5, που περιέχει 0,15 M NaCl και 1% NaN₃, επί 24 h με δύο επιπλέον αλλαγές του διαλύματος διαπίδυσης τουλάχιστον. Κατόπιν, το διαπίδυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε υάλινο φιαλίδιο και φυλάσσεται στους 4 °C μέχρι τη χρήση του.

6.4 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Πρότυπα διαλύματα κ- καζεΐνης, πρωτεΐνης φιστικιού, πρωτεΐνης σόγιας και γλιαδίνης παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης καθώς και σε νερό του δικτύου με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων από διαλύματα παρακαταθήκης. Για την περίπτωση του προσδιορισμού της νοθείας κατσικίσιου γάλακτος με αγελαδινό παρασκευάστηκαν μίγματα κατσικίσιου με αγελαδινό γάλα (παστεριωμένα, υψηλής, παστερίωσης και φρέσκο).

6.4.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων κ- καζεΐνης, πρωτεΐνης φιστικιού, πρωτεΐνης σόγιας και γλιαδίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Κατάλληλη ποσότητα εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος κ-καζεΐνης από αγελαδινό γάλα σε μορφή σκόνης ζυγίστηκε και διαλύθηκε σε διάλυμα ακινητοποίησης προκειμένου να παρασκευαστεί το διάλυμα παρακαταθήκης κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 1 mg/mL. Ποσότητα εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος γλιαδίνης από σιτάρι σε μορφή σκόνης ζυγίστηκε, προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 και αφέθηκε να διαλυθεί υπό ανάδευση επί 24 h σε θερμοκρασία 4 °C. Κατόπιν, το υπερκείμενο παρελήφθη και φυγοκεντρήθηκε επί 10 min στα 10.000 g προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η ποσότητα της γλιαδίνης που δεν είχε διαλυθεί. Η συγκέντρωση του διαλύματος αυτού προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 357 nm χρησιμοποιώντας ως τιμή του συντελεστή μοριακής απορρόφησης την τιμή 1.04638 (για συγκέντρωση 1 mg/mL) . Στα διαλύματα της καζεΐνης και της γλιαδίνης προστέθηκε 0.05% (β/ο) NaN₃ και φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C. Τα εκχυλίσματα των πρωτεϊνών φιστικιού και σόγιας, ήταν παρασκευάσματα του RIKILT και παρελήφθησαν σε συγκεντρώσεις 2 mg/mL και 2,1 mg/mL, αντίστοιχα. Τα διαλύματα αυτά κατανεμήθηκαν σε ποσότητες των 10 µL και φυλάχθηκαν στους -20 °C.

Από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης είτε σε νερό δικτύου. Για την ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση οι συγκεντρώσεις των προτύπων κυμαίνονταν από 0,01 έως 1 µg/mL για την καζεΐνη, 0,05 έως 2 µg/mL για την πρωτεΐνη φιστικιού και τη σόγια και 0,05 έως 10 µg/mL για τη γλιαδίνη.

6.4.2 Παρασκευή προτύπων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα

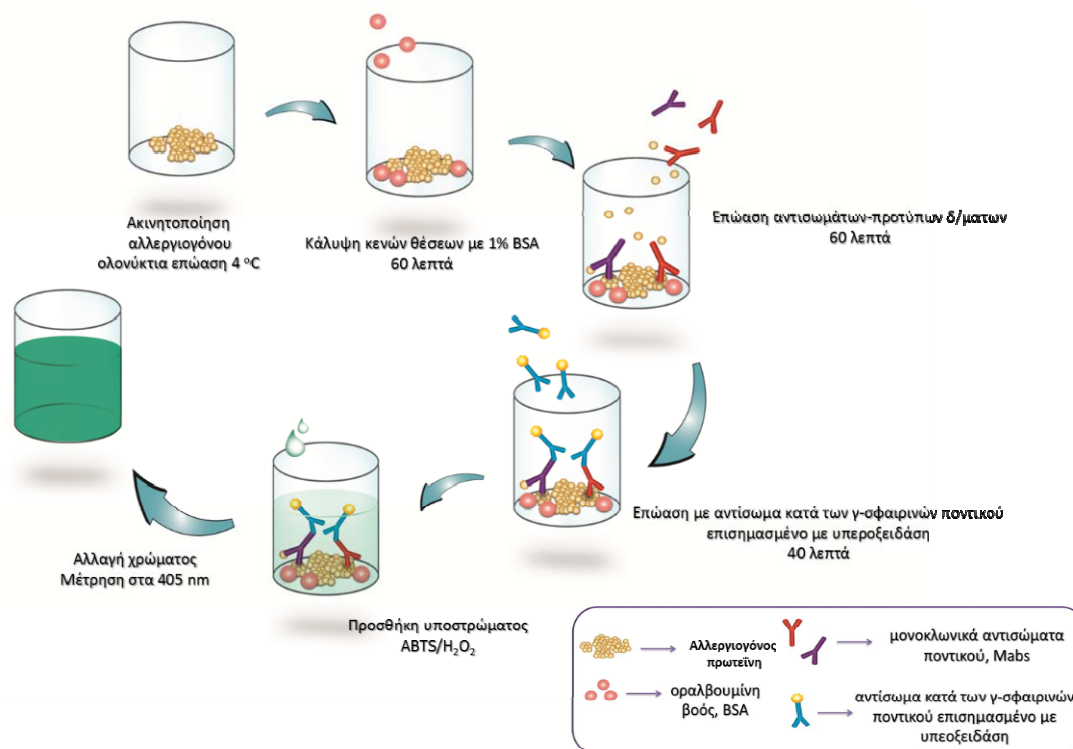
Για την παρασκευή προτύπων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα φρέσκου αγελαδινού γάλακτος, παστεριωμένου αγελαδινού γάλακτος ΔΕΛΤΑ ή υψηλής παστερίωσης αγελαδινού γάλακτος ΔΕΛΤΑ σε κατσικίσιο γάλα έτσι ώστε να προκύψουν δείγματα που κυμαίνονται από 0,001% έως 1% (o/o) στην περίπτωση της ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυσης. Στη μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοανάλυση τα πρότυπα δείγματα κυμαίνονταν από 0,00001% έως 0,01% (o/o). Στη συνέχεια στα δείγματα αυτά προστέθηκε NaN_3 , κατανεμήθηκαν σε κλάσματα των 0.5 mL και φυλάχθηκαν στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Πριν τη χρήση τους τα πρότυπα αποψύχονται και ομογενοποιούνται σε λουτρό υπερήχων επί 15 min.

6.5 Ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σύμφωνα με τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό (Εικόνα 16), σε φρεάτια μικροπιλοδότησης στα οποία έχει προσροφηθεί η αλλεργιογόνος πρωτεΐνη, μετά από αποκλεισμό των ελευθέρων θέσεων δέσμευσης της επιφάνειας των φρεατίων με αδρανή πρωτεΐνη, προστίθεται μίγμα προτύπων διαλυμάτων της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης ή δειγμάτων προς ανάλυση με μονοκλωνικά/πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης σε περιορισμένη συγκέντρωση ως προς τον αναλύτη. Το αντίσωμα που περιέχεται στο μίγμα προσδένεται στο ακινητοποιημένο στην επιφάνεια αλλεργιογόνο κατά τρόπο αντιστρόφως ανάλογο προς τη συγκέντρωση του αλλεργιογόνου στο πρότυπο διάλυμα ή στο δείγμα (μέγιστη δέσμευση του αντισώματος επιτυγχάνεται απουσία του αλλεργιογόνου). Μετά την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου προστίθεται αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών ποντικού ή κουνελιού (δεύτερο αντίσωμα) συζευγμένο με HRP, το οποίο δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ανοσοσυμπλέγματα. Η ανίχνευση των ακινητοποιημένων ανοσοσυμπλεγμάτων πραγματοποιείται με προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος της υπεροξειδάσης ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{ABTS}$) και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Για την ποσοτικοποίηση κατασκευάζεται καμπύλη των λαμβανομένων τιμών απορρόφησης για τα διαφορετικά πρότυπα διαλύματα συναρτήσει της συγκέντρωσης τους (καμπύλη βαθμονόμησης). Η συγκέντρωση του αλλεργιογόνου στα άγνωστα δείγματα προσδιορίζεται των τιμών

απορρόφησης που παρέχουν μέσω αντιστοίχισης τους στην καμπύλη βαθμονόμησης.



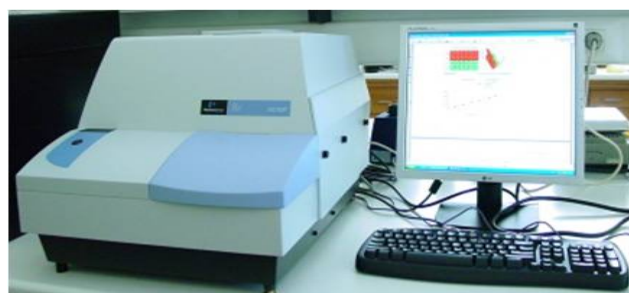
Εικόνα 16: Ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικός προσδιορισμός (ELISA) αλλεργιογόνου πρωτεΐνης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης

6.5.1 Ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικός προσδιορισμός κ- καζεΐνης, πρωτεΐνης φυσικικού, πρωτεΐνης σόγιας και γλιαδίνης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης προστίθενται 100 μ L διαλύματος αλλεργιογόνου πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης (Πίνακας 1), σε διάλυμα ακινητοποίησης και αφήνονται να προσροφηθούν επί 18 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φρεάτια εκπλένονται δύο φορές με 300 μ L διαλύματος έκπλυσης 1 και προστίθενται 300 μ L διαλύματος αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων των φρεατίων επί 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση των φρεατίων όπως προηγουμένως και προσθήκη σε αυτά 100 μ L μίγματος προτύπων διαλυμάτων αλλεργιογόνου πρωτεΐνης ή αγνώστων δειγμάτων νερού έκπλυσης σωληνώσεων από βιομηχανία

τροφίμων με μονοκλωνικά/ πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης σε αναλογία 1:1 (Πίνακας 1), τα οποία είχαν προηγουμένως προεπωαστεί για 1 h. Η ανοσοαντίδραση πραγματοποιήθηκε επί 1h υπό ανάδευση. Στη συνέχεια τα φρεάτια εκπλένονται τέσσερις φορές με 300 μ L διαλύματος έκπλυσης 2 και προστίθενται 100 μ L διαλύματος αντισώματος αιγός κατά των γ -σφαιρινών ποντικού ή κουνελιού συζευγμένο με HRP, κατάλληλης συγκέντρωσης (Πίνακας 1) στο αντίστοιχο διάλυμα αραίωσης επί 45 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση των φρεατίων όπως προηγουμένως και προσθήκη σε κάθε φρεάτιο 100 μ L διαλύματος υποστρώματος της HRP. Τα φρεάτια αναδεύονται επί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν μετράται η οπτική απορρόφηση στα 405 nm με τη συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης μικροφρεατίων που παρουσιάζεται στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17: Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης ELISA, Victor³ Multilabel Readers (PerkinElmer, ΗΠΑ)

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις ακινητοποιημένης πρωτεΐνης, αντισωμάτων ανοσοαντίδρασης και δευτέρων αντισωμάτων

Αλλεργιογόνος πρωτεΐνη	Συγκέντρωση ακινητοποιημένης πρωτεΐνης	Συγκέντρωση αντισώματος ανοσοαντίδρασης	Συγκέντρωση 2 ^{ου} αντισώματος
κ- καζεΐνη	1 μ g/mL	100 ng/mL 33-4G10	Αντίσωμα αιγός κατά των γ -σφαιρινών ποντικού σε αραίωση 1:2000
Πρωτεΐνη φιστικιού	5 μ g/mL	50 ng/mL 51-12D2	Αντίσωμα αιγός κατά των γ -σφαιρινών ποντικού σε αραίωση 1:2000
Πρωτεΐνη σόγιας	2 μ g/mL	50 ng/mL 26-5G4	Αντίσωμα αιγός κατά των γ -σφαιρινών ποντικού σε αραίωση 1:2000
Γλιαδίνη	0,5 μ g/mL	1:1000 G9144	Αντίσωμα αιγός κατά των γ -σφαιρινών κουνελιού σε αραίωση: 1:1000

6.5.2 Ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

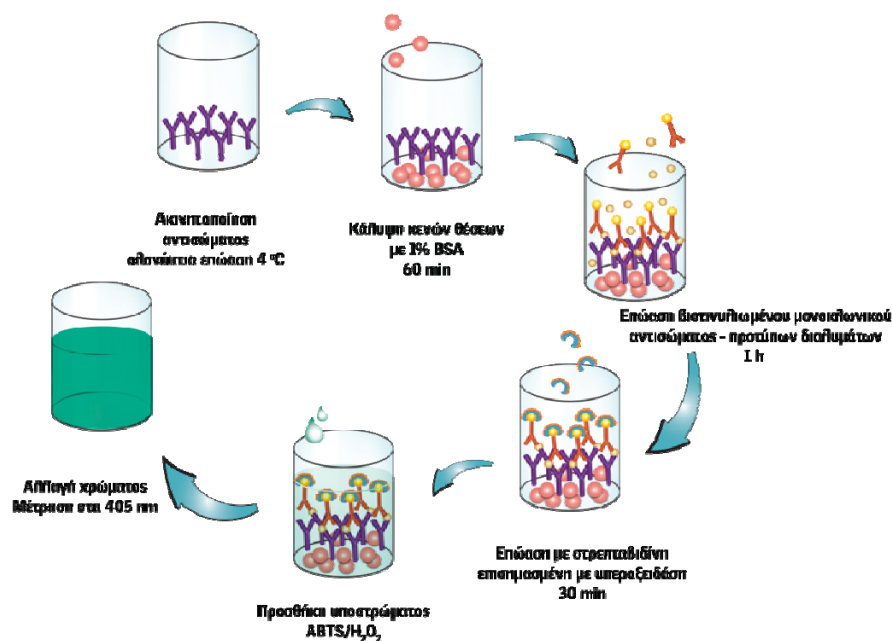
Σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης προστίθενται 100 μL διαλύματος κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, σε διάλυμα ακινητοποίησης και αφήνονται να προσροφηθούν για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φρεάτια εκπλένονται δύο φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 1 και προστίθενται 300 μL διαλύματος αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων των φρεατίων για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση των φρεατίων όπως προηγουμένως και προσθήκη σε αυτά 100 μL μίγματος προτύπων δειγμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο ή αγνώστων δειγμάτων με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 100 ng/mL , (αναλογία 1:1), τα οποία είχαν προηγουμένως προεπωαστεί επί 1 h. Τα πρότυπα διαλύματα είχαν παρασκευαστεί όπως περιγράφεται στην υποπαράγραφο 6.3.2. Η ανοσοαντίδραση πραγματοποιήθηκε για 1h υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, τα φρεάτια εκπλένονται τέσσερις φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης 2 και προστίθενται 100 μL αντισώματος αιγός κατά των γ -σφαιρινών ποντικού συζευγμένο με HRP σε αραιώση 1:2000, για 45 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση των φρεατίων όπως προηγουμένως και προσθήκη σε κάθε φρεάτιο 100 μL διαλύματος υποστρώματος της HRP, αφήνεται υπό ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης πραγματοποιείται στα 405 nm.

6.6 Μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός της κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σύμφωνα με το μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμομετρικό προσδιορισμό (Εικόνα 18), σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης προσροφάται μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της κ-καζεΐνης/αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα και πραγματοποιείται αποκλεισμός των ελευθέρων θέσεων δέσμευσης των φρεατίων με αδρανή πρωτεΐνη. Ακολουθεί επώαση με μίγματα προτύπων διαλυμάτων της κ-καζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα ή κατσικίσιο γάλα με το βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα σε περίσσεια ως προς τον υπό προσδιορισμό αναλύτη. Σ' αυτό το στάδιο, ο αναλύτης δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο αντίσωμα ενώ ταυτόχρονα δεσμεύεται από το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα σε διαφορετικό επίτοπο

δημιουργώντας ανοσοσύμπλεγμα τύπου sandwich (αντίσωμα-αντιγόνο-βιοτινυλιωμένο αντίσωμα). Ο προσδιορισμός ολοκληρώνεται με αντίδραση των βιοτινυλιωμένων συζευγμάτων με str-HRP, προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος της υπεροξειδάσης και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης. Στην περίπτωση απουσίας του αλλεργιογόνου στο διάλυμα λαμβάνεται το χαμηλότερο σήμα (τυφλό) ενώ το μετρούμενο σήμα αυξάνεται αναλόγως της συγκέντρωσης του αλλεργιογόνου στο πρότυπο διάλυμα ή στο δείγμα.



Εικόνα 18: Μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικός προσδιορισμός αλλεργιογόνου πρωτεΐνης σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

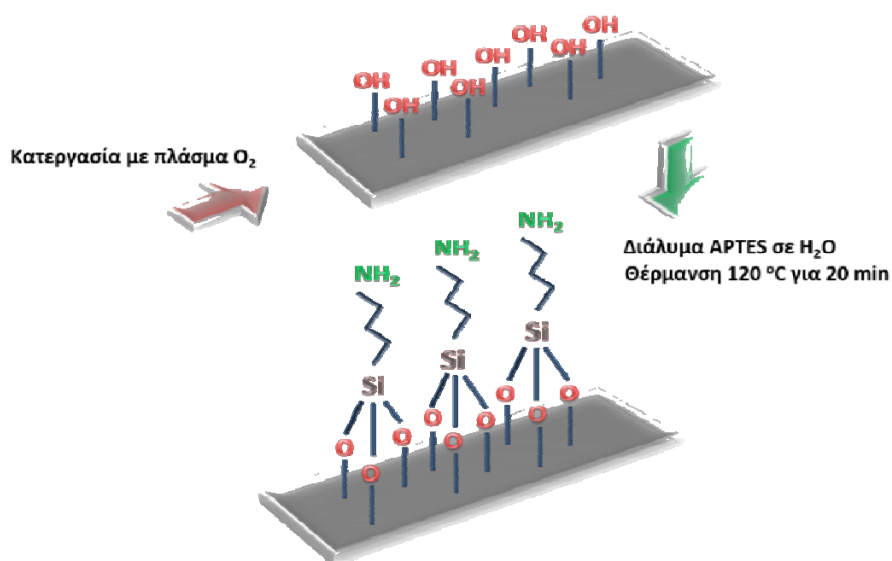
Σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης προστίθενται 100 μ L διαλύματος μονοκλωνικού αντισώματος 33-6A10 έναντι της κ-καζεΐνηςσυγκεντρώσεως 5 μ g/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης και αφήνονται να προσροφηθούν επί 18 h σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα φρεάτια εκπλένονται δύο φορές με 300 μ L διαλύματος έκπλυσης και προστίθενται 300 μ L διαλύματος αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων των φρεατίων επί 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί έκπλυση των φρεατίων όπως προηγουμένως και προσθήκη 100 μ L μίγματος προτύπων διαλυμάτων κ-καζεΐνης και του βιοτινυλιωμένου μονοκλωνικού αντισώματος συγκέντρωσης 5 μ g/mL σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης υπό ανάδευση για 1 h. Στη συνέχεια, τα φρεάτια εκπλένονται τέσσερις φορές με 300 μ L

διαλύματος έκπλυσης και προστίθενται 100 μL streptavidin-HRP, συγκέντρωσης 250 ng/mL. Ακολουθεί επώαση επί 30 min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και έκπλυση των φρεατίων δύο φορές. Τέλος, στα φρεάτια προστίθενται 100 μL διαλύματος υποστρώματος της HRP και μετά από ανάδευση τους επί 30 min σε θερμοκρασία δωματίου μετράται η οπτική απορρόφηση στα φρεάτια στα 405 nm.

6.7 Μέθοδος υδροφιλοποίησης και χημικής τροποποίησης των ψηφίδων πυριτίου με αμινο-σιλάνιο.

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η σιλανοποίηση των ψηφίδων πυριτίου απαιτεί καθαρισμό της επιφάνειας και δημιουργία ελεύθερων υδροξυλομάδων (σιλανόλες) πριν τη σιλανοποίησή τους. Κατόπιν, κατά την εμβάπτιση των υδροφιλοποιημένων επιφανειών σε διάλυμα 3-αμινο-προπυλο-τριαιθοξυ-σιλανίου (APTES), οι αιθόξυ-ομάδες του σιλανίου υδρολύονται σχηματίζοντας ελεύθερες σιλανόλες, οι οποίες σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις σιλανόλες της επιφάνειας. Στη συνέχεια, οι ψηφίδες υπόκεινται σε θερμική κατεργασία στους 120 °C οπότε με την απομάκρυνση μορίων νερού τα μόρια του σιλανίου δημιουργούν ομοιοπολικούς δεσμούς τόσο με την επιφάνεια όσο και μεταξύ τους (Εικόνα 19). Οι επιφάνειες που προκύπτουν είναι κατάλληλες τόσο για προσρόφηση βιομορίων όσο και για ομοιοπολική σύνδεσή τους μέσω των ελεύθερων αμινομάδων της επιφάνειας.



Εικόνα 19: Υδροφιλοποίηση και χημική τροποποίηση- σιλανοποίηση ψηφίδων πυριτίου με APTES.

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Οι ψηφίδες του πυριτίου εμβαπτίζονται σε μίγμα πυκνού H_2SO_4/H_2O_2 σε αναλογία 1:3 σε υάλινο τρυβλίο για 30 sec σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια εκπλένονται με περίσσεια νερού και ξηραίνονται σε ρεύμα αζώτου. Έπειτα, οι ψηφίδες πυριτίου τοποθετούνται στον αντιδραστήρα εγχάραξης με ενεργά ιόντα και υφίστανται κατεργασία σε πλάσμα οξυγόνου υπό πίεση 10 mTorr για 30 sec ώστε να επιτευχθεί υδροφιλοποίηση τους μέσω του σχηματισμού επιφανειακών υδροξυλίων. Για την αμινο-σιλανοποίησή τους, οι υδροφιλοποιημένες επιφάνειες εμβαπτίζονται σε διάλυμα APTES, συγκέντρωσης 0,5 % (ο/ο) σε δισαπτεσταγμένο νερό επί 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια εκπλένονται με δισαπτεσταγμένο νερό επί 30 sec, ξηραίνονται υπό ροή αζώτου και τοποθετούνται σε κλίβανο επί 20 min σε θερμοκρασία 120 °C, προκειμένου να επιτευχθεί ομοιοπολική σύνδεση των μορίων σιλανίου με την επιφάνεια. Ακολούθως, οι ψηφίδες φυλάσσονται σε ξηραντήρα επί 2-7 ημέρες πριν τη χρήση τους.

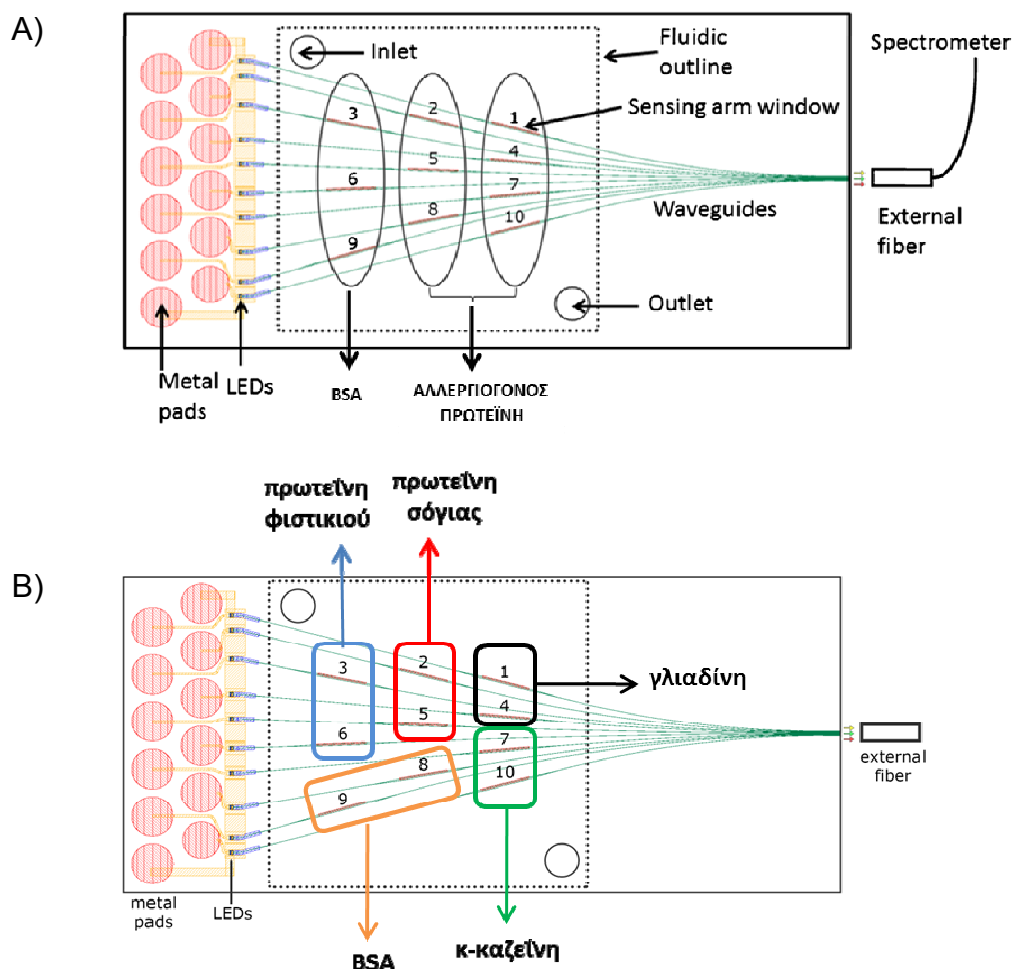
6.8 Ακίνητοποίηση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε ψηφίδες πυριτίου-αισθητήρες

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η ακίνητοποίηση της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης και της οραλβουμίνης βοός στις χημικά τροποποιημένες ψηφίδες πυριτίου πραγματοποιείται μέσω εναπόθεσης διαλυμάτων των ουσιών αυτών στην επιφάνεια των 600 μm του αισθητηρίου βραχίονα του MZI. Στη συνέχεια οι ψηφίδες επωάζονται προκειμένου να επιτευχθεί προσρόφηση των πρωτεϊνών στην συγκεκριμένη περιοχή της επιφάνειας της ψηφίδας. Η βιολογική τροποποίηση του αισθητηρίου βραχίονα κάθε MZI του οπτοηλεκτρονικού αισθητήρα πραγματοποιείται με εναπόθεση στην περιοχή πάνω από τον βραχίονα συστοιχίας διαδοχικών αλληλοεπικαλυπτόμενων μικροκηλίδων του διαλύματος ακίνητοποίησης της κάθε πρωτεΐνης με χρήση συσκευής αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων και κατάλληλου πρωτοκόλλου οδήγησης του ρομποτικού βραχίονα της συσκευής.

Για την παρασκευή ψηφίδων για την ανίχνευση μίας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης (Εικόνα 20Α), ακίνητοποιήθηκε η εκάστοτε πρωτεΐνη στους αισθητήριους βραχίονες των επτά από τα δέκα MZIs της ψηφίδας, ενώ στον αισθητήριο βραχίονα των τριών εναπομενόντων ακίνητοποιήθηκε BSA, για τον έλεγχο της μη ειδικής δέσμευσης. Στην περίπτωση ταυτόχρονης ανίχνευσης κ-καζεΐνης, πρωτεΐνης φιστικιού, πρωτεΐνης σόγιας και γλιαδίνης, οι εν λόγω αλλεργιογόνες

πρωτεΐνες ακινητοποιούνται ανά δυάδες σε οκτώ MZI, ενώ στα υπόλοιπα δύο εναποτίθεται BSA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 20B.



Εικόνα 20: A) Ακινητοποίηση μίας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης και B) ακινητοποίηση τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε ψηφίδα πυριτίου

Η συσκευή εναπόθεσης μικροκηλίδων (Εικόνα 21) περιλαμβάνει: (α) έναν θάλαμο με ρομποτικό βραχίονα κίνησης των ακίδων σε τρεις διαστάσεις, (β) μονάδα για τον έλεγχο και τη ρύθμιση της υγρασίας του θαλάμου, (γ) δύο πλαστικούς περιέκτες για την αποθήκευση του διαλύματος έκπλυσης της ακίδας καθώς επίσης και τη συλλογή των υγρών της έκπλυσης, (δ) εξωτερικά συνδεδεμένη αντλία αέρος που διοχετεύει αέρα κατά τη διάρκεια των εκπλύσεων για το στέγνωμα της ακίδας, και (ε) μονάδα ελέγχου της θερμοκρασίας στο εσωτερικό του θαλάμου και κυρίως της βάσης που τοποθετούνται τα υποστρώματα στα οποία θα πραγματοποιηθεί η εναπόθεση των διαλυμάτων. Ο ρομποτικός βραχίονας κινείται καθέτως και οριζοντίως (x,y,z) με ακρίβεια $\pm 2,5$ μm και φέρει κεφαλή στην οποία τοποθετούνται ακίδες μέσω των οποίων

πραγματοποιείται η μεταφορά του διαλύματος από τα φρεάτια μικροτιλοδότησης στην επιφάνεια διοξειδίου του πυριτίου.



Εικόνα 21: Συσκευή αυτόματης εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™MiniArrayer της Bio-Rad.

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Στη βάση του θαλάμου της συσκευής τοποθετούνται οι ψηφίδες του πυριτίου-αισθητήρες, όπως και το πλακίδιο με τα φρεάτια που φέρουν τα διαλύματα των εν λόγω αλλεργιογόνων πρωτεϊνών και της BSA. Πιο συγκεκριμένα, το διάλυμα της κάθε πρωτεΐνης έχει συγκέντρωση 100 µg/mL και έχει παρασκευαστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης.

Η εναπόθεση του διαλύματος αυτού στην περιοχή των 600 µm του αισθητηρίου βραχίονα της ψηφίδας πραγματοποιείται μέσω συμπαγούς ακίδας που διαθέτει πεπλατυσμένη κεφαλή διαμέτρου 375 µm, η κίνηση της οποίας εκτελείται μέσω του λογισμικού ελέγχου της ρομποτικής κεφαλής. Αρχικά η ακίδα καθοδηγείται στο φρεάτιο που περιέχει το διάλυμα της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, εμβαπτίζεται σε αυτό με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα υμένιο από το διάλυμα στην άκρη της ακίδας. Η εναπόθεση του υμενίου σε συγκεκριμένη θέση πάνω στη χημικά τροποποιημένη ψηφίδα πραγματοποιείται με επαφή και δημιουργείται μια κηλίδα μεγέθους περίπου 300-400 µm. Για την ομοιογενή κάλυψη του αισθητηρίου βραχίονα των MZIs κατασκευάζονται μικροσυστοιχίες κάτω από συγκεκριμένες παραμέτρους εναπόθεσης (Πίνακας 2).

Μετά την εναπόθεση μίας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης και πριν την εναπόθεση της επόμενης αλλεργιογόνου πρωτεΐνης ή της BSA, λαμβάνει χώρα η έκπλυση της ακίδας. Για την έκπλυση αυτή υπάρχει εντός του θαλάμου λουτρό με διάλυμα επιφανειοδραστικού (1% (o/o) TritonX100 σε απεσταγμένο νερό) καθώς και

διάταξη για την έκπλυση των ακίδων με απεσταγμένο νερό και ξήρανσή τους με ρεύμα αέρα.

Πίνακας 2 : Συνθήκες εναπόθεσης μικροκηλίδων με χρήση συμπαγούς ακίδας.

Θάλαμος	
Θερμοκρασία	15 °C
Υγρασία	65 % (v/v)
Πλήρωση ακίδας	
Ταχύτητα προσέγγισης ακίδας στο φρεάτιο	15 mm/s
Χρονική διάρκεια εμβάπτισης της ακίδας στο φρεάτιο	1000 ms
Ταχύτητα απομάκρυνσης της ακίδας από το φρεάτιο	15 mm/s
Εναπόθεση διαλύματος	
Ταχύτητα προσέγγισης ακίδας στο πλακίδιο	10 mm/s
Χρονική διάρκεια εναπόθεσης του διαλύματος	25 ms
Θέση z-άξονα	0 mm

Κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης ο θάλαμος βρίσκεται υπό συνθήκες σταθερής υγρασίας (~70%), ενώ η επιφάνεια με την οποία έρχεται σε επαφή η ψηφίδα πυριτίου ψύχεται, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος. Για τον ίδιο λόγο, η ολονύκτια επώαση της ψηφίδας με το εναποτιθέμενο διάλυμα πραγματοποιείται υπό σταθερή υγρασία στους 4°C προκειμένου να επιτευχθεί η προσρόφηση της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης. Μετά την ολονύκτια επώαση, η ψηφίδα εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Στη συνέχεια, εμβαπτίζεται σε διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων της επιφάνειας επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα και απεσταγμένο νερό και ξηραίνεται σε ρεύμα αζώτου. Ειδικά, για τον προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο το διάλυμα κάλυψης των κενών θέσεων της επιφάνειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν γάλα κασίκας αραιωμένο εκατό φορές σε διάλυμα έκπλυσης. Η βιολογικά πλέον τροποποιημένη ψηφίδα χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αλλεργιογόνων πρωτεϊνών.

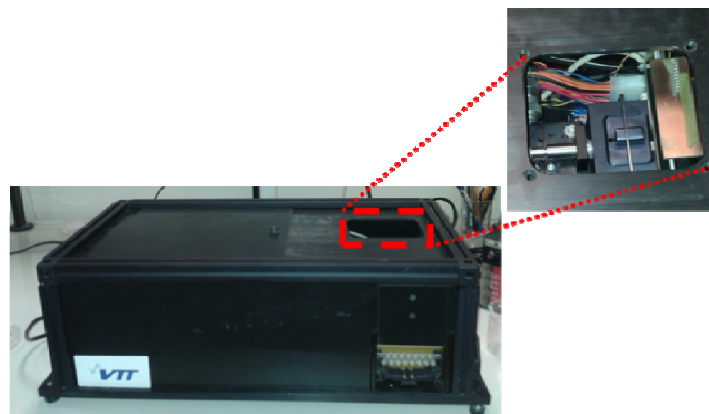
6.9 Ανίχνευση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα τύπου Mach-Zehnder.

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για την ομαλή διαβίβαση διαφόρων διαλυμάτων πάνω από την ψηφίδα πυριτίου στην οποία έχει ακινητοποιηθεί η προς ανάλυση αλλεργιογόνος πρωτεΐνη, τοποθετείται μικρορευστομηχανική κυψελίδα και στη συνέχεια η ψηφίδα τοποθετείται σε ειδικό υποδοχέα (Εικόνα 22Α) και τελικά στην κεφαλή της πειραματικής διάταξης (Εικόνα 22Β).



A)



B)

Εικόνα 22: Α) Ψηφίδα πυριτίου με ενσωματωμένη μικρορευστομηχανική κυψελίδα πάνω σε ειδική βάση και Β) Πειραματική διάταξη ανίχνευσης βιομορίων σε πραγματικό χρόνο χωρίς τη χρήση ιχνηθετών.

Στο επάνω μέρος της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας ενσωματώνονται κατάλληλα σωληνάκια μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η διασύνδεση με εξωτερική αντλία για τη διαβίβαση των διαφόρων διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την ανοσοανάλυση. Κατά τη διάρκεια της ανοσοαντίδρασης τα αντισώματα έναντι της προς ανάλυση αλλεργιογόνου πρωτεΐνης δεσμεύονται στα μόρια της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης που είναι ακινητοποιημένα στην επιφάνεια οδηγώντας σε αύξηση του πάχους της βιομοριακής στιβάδας στην επιφάνεια της ψηφίδας. Η

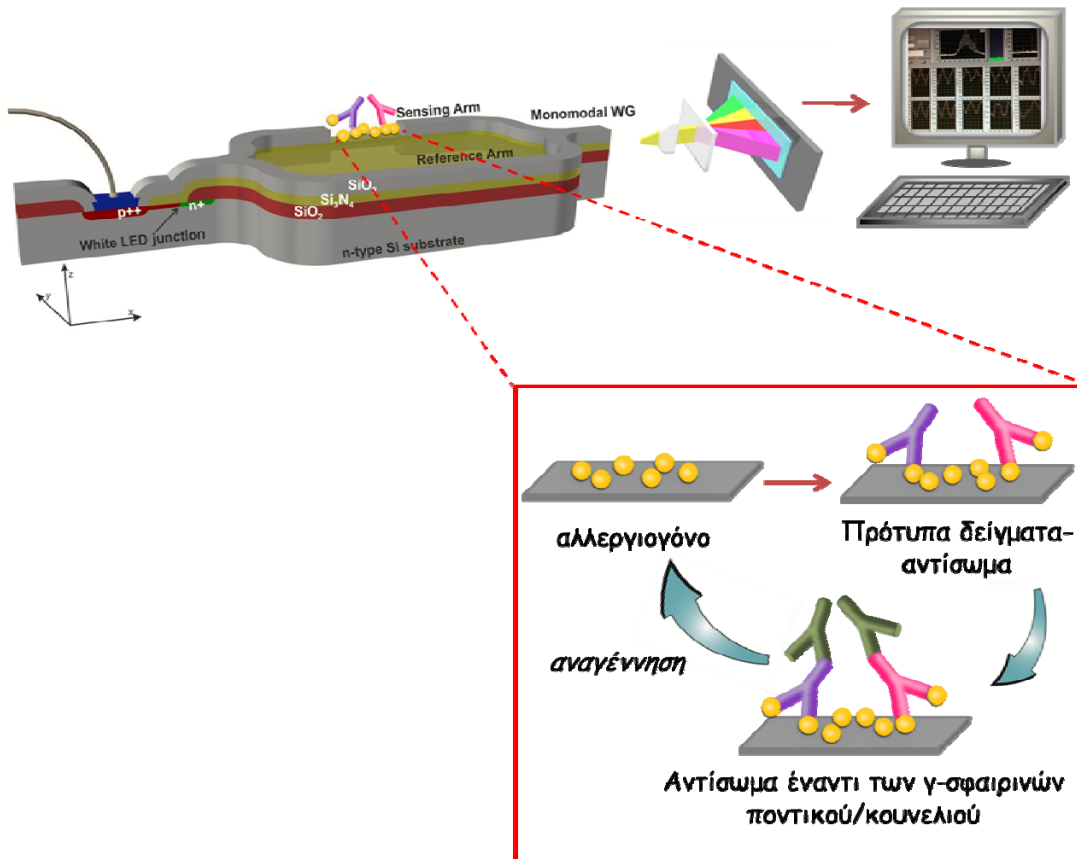
αύξηση αυτή προκαλεί μεταβολή του δείκτη διάθλασης στην επιφάνεια του αισθητηρίου βραχώνα και μετατόπιση του φάσματος συμβολής η οποία καταγράφεται σε πραγματικό χρόνο από το λογισμικό σύστημα. Λόγω του ότι ο ανοσοχημικός προσδιορισμός των προς ανάλυση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών είναι ανταγωνιστικού τύπου η αύξηση του πάχους της βιομοριακής στιβάδας και συνεπώς το μέγεθος της μετατόπισης του φάσματος συμβολής είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης στο πρότυπο διάλυμα ή δείγμα. Χημικά και βιολογικά τροποποιημένες ψηφίδες πυριτίου.

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Στη βιολογικά τροποποιημένη με αλλεργιογόνο πρωτεΐνη ψηφίδα πυριτίου τοποθετείται μικρορευστομηχανική κυψελίδα (καπάκι) προκειμένου να επιτραπεί η ομαλή διέλευση υγρών πάνω από την ψηφίδα. Η κυψελίδα αυτή αποτελείται από φύλλο πολύ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) πάχους 800 μm , με ενσωματωμένη οπή εισόδου και εξόδου, στο οποίο έχει εναποτεθεί μέσω φωτολιθογραφίας φωτοευαίσθητο αυτοκόλλητο υμένιο πάχους 75 μm . Στη συνέχεια, η ψηφίδα πυριτίου με την ενσωματωμένη κυψελίδα τοποθετείται σε ειδικό υποδοχέα και τελικά στην κεφαλή της διάταξης μέτρησης, η οποία παρέχει τόσο την ηλεκτρική τροφοδοσία όσο και τις σωληνώσεις για την είσοδο και έξοδο των αντιδραστηρίων. Προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν διαρροές, ελέγχεται η στεγανότητα του συστήματος. Παράλληλα πραγματοποιείται ευθυγράμμιση και εστίαση της οπτικής ίνας που μεταφέρει το φάσμα εξόδου στο φασματοφωτόμετρο με την ψηφίδα πυριτίου.

Για την ανάλυση παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης, τα οποία αναμειγνύονται με το αντίστοιχο διάλυμα αντισωμάτων για την εκάστοτε αλλεργιογόνο πρωτεΐνη σε αναλογία 1:1 και αφήνονται για προεπώαση επί 10 min (Πίνακας 3). Για τη λήψη του σήματος υποβάθρου, πραγματοποιείται διέλευση διαλύματος ανοσοαντίδρασης επί 5 min πάνω από την ψηφίδα πυριτίου. Στη συνέχεια, 100 μL από τα προεπωασμένα μίγματα προτύπων διαλυμάτων-αντισωμάτων ενίενται μέσω βαλβίδας εισαγωγής και διαβιβάζονται στη μικρορευστομηχανική κυψελίδα επί 200 sec. Κατόπιν, 100 μL αντισώματος αιγός κατά των γ -σφαιρινών ποντικού/κουνελιού κατάλληλης συγκέντρωσης (Πίνακας 3) διαβιβάζονται μέσω της βαλβίδας εισαγωγής επί 200 sec. Η ταχύτητα ροής του διαλύματος ανοσοαντίδρασης ήταν 35 $\mu\text{L}/\text{min}$. Μετά το τέλος της ανοσοαντίδρασης

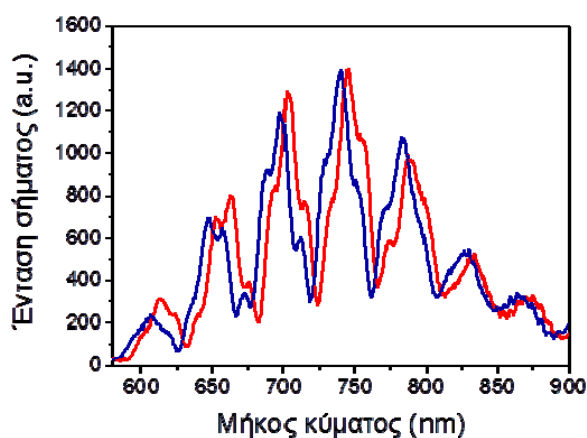
διαβιβάζεται διάλυμα αναγέννησης της επιφάνειας (HCl 50 mM) ώστε να απομακρυνθούν τα προσδεδεμένα στο ακινητοποιημένο αλλεργιογόνο αντισώματα και να επαναχρησιμοποιηθεί η ψηφίδα για την ανάλυση του επόμενου δείγματος (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση της ανοσοαντίδρασης: εισαγωγή μίγματος προτύπων διαλυμάτων- αντισωμάτων και στη συνέχεια διέλευση δευτέρου αντισώματος πάνω από την επιφάνεια της ψηφίδας πυριτίου. Αναγέννηση της επιφάνειας μετά την ολοκλήρωση κάθε κύκλου ανοσοαντίδρασης.

Τα φάσματα συμβολής των δέκα MZIs καταγράφονται συνεχώς με περίοδο 10 sec και χρόνο ολοκλήρωσης 1 sec για κάθε MZI. Για την παρακολούθηση και την καταγραφή του φάσματος συμβολής κάθε αισθητήρα στην ψηφίδα χρησιμοποιείται οπτική ίνα, η οποία καταλήγει σε φασματοφωτόμετρο. Στην εικόνα 24 παρουσιάζεται ένα τυπικό φάσμα συμβολής που λαμβάνεται στην έξοδο ενός MZI (μπλε γραμμή), όπως επίσης και η μετατόπιση του φάσματος συμβολής μετά την ανοσοαντίδραση (κόκκινη γραμμή). Τα φάσματα συμβολής που λαμβάνονται από τα δέκα MZIs υπόκεινται σε διακριτό μετασχηματισμό Fourier, προκειμένου να

μετατραπούν οι μετατοπίσεις του φάσματος συμβολής σε μεταβολές φάσης εκφραζόμενες σε ακτίνια (radians).



Εικόνα 24: Τυπικό φάσμα συμβολής ενός MZI πριν την ανοσοαντίδραση (μπλε γραμμή) και μετατόπιση του φάσματος μετά την ανοσοαντίδραση (κόκκινη γραμμή)

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις προτύπων αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, αντισωμάτων ανοσοαντίδρασης και δευτέρων αντισωμάτων

Αλλεργιογόνος πρωτεΐνη	Συγκέντρωση προτύπων	Συγκέντρωση αντισώματος	Συγκέντρωση 2 ^{ου} αντισώματος
κ- καζεΐνη	0,1 µg/mL -2 µg/mL	0,25 µg/mL 33-4G10 0,25 µg/mL 33-6A10	Αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού 10 µg/mL
Πρωτεΐνη φιστικιού	2 µg/mL -20 µg/mL	1 µg/mL 44-4G2 1 µg/mL 51-5G9	Αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού 10 µg/mL
Πρωτεΐνη σόγιας	2 µg/mL -16 µg/mL	1,5 µg/mL 26-6C9 1,5 µg/mL 26-5G4	Αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού 10 µg/mL
Γλιαδίνη	0,2 µg/mL -20 µg/mL	1:80 G9144	Αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού 10 µg/mL

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης ο επί τοις εκατό λόγος του σήματος του κάθε προτύπου βαθμονόμησης (B_x) ως προς το σήμα του προτύπου που δεν περιέχει αλλεργιογόνο πρωτεΐνη (B_0) (μηδενικό πρότυπο) αντιστοιχίζεται με τη συγκέντρωση των προτύπων διαλυμάτων της εκάστοτε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης.

Στην περίπτωση της ταυτόχρονης ανίχνευσης των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών ενίενται 100 µL μίγματος προτύπων διαλυμάτων που περιέχουν όλες

τις προς μέτρηση αλλεργιογόνες πρωτεΐνες καθώς και τα αντίστοιχα έναντι αυτών αντισώματα στις συγκεντρώσεις που έχουν προαναφερθεί στον πίνακα 3, επί 200 sec και στη συνέχεια διαβιβάζεται μίγμα αντισωμάτων κατά των γ-σφαιρινών ποντικού και κουνελιού σε συγκέντρωση 10 µg/mL το καθένα.

6.10 Ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα τύπου Mach-Zehnder.

ο ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αρχή μεθόδου της παραγράφου αυτής βασίζεται στην αρχή μεθόδου της παραγράφου 6.9.

ο ΕΚΤΕΛΕΣΗ

Για τον προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα (0-1% (ο/ο) αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα) τα οποία αραιώνονται 50 φορές σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης και αναμειγνύονται με διάλυμα μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 1 µg/mL το καθένα (τελική συγκέντρωση 0,25 µg/mL το καθένα), σε αναλογία 1:1. Το μίγμα αντισωμάτων-προτύπων διαλυμάτων αφήνεται για προεπώαση επί 10 min. Πριν την ανοσοαντίδραση, για τη λήψη του σήματος υποβάθρου, πραγματοποιείται διέλευση κασικίσιου γάλακτος αραιωμένου 100 φορές σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης επί 5 min πάνω από την ψηφίδα πυριτίου. Με τη βοήθεια εισαγωγέα δείγματος με βρόχο σταθερού όγκου, 100 µL τα προεπωασμένα μίγματα διαβιβάζονται πάνω από την επιφάνεια της ψηφίδας για 2,5 min με ταχύτητα ροής 35 µL/min, ενώ στη συνέχεια διαβιβάζεται αντίσωμα έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού συγκεντρώσεως 10 µg/mL, για ακόμη 2,5 min. Μετά την ολοκλήρωση κάθε κύκλου ανοσοαντίδρασης διαβιβάζεται από την επιφάνεια της ψηφίδας διάλυμα αναγέννησης HCl 50 mM για 200 s. Η καταγραφή και ο τρόπος κατασκευής της καμπύλης βαθμονόμησης είναι ο ίδιος με αυτόν που περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 6.9.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου ανοσοενζυμικού προσδιορισμού της αγελαδινού κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης

Πριν από την ανάπτυξη των ανοσοχημικών προσδιορισμών στον οπτικό αισθητήρα, αναπτύχθηκαν για κάθε αλλεργιογόνο ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί (ELISA) σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Οι μέθοδοι αυτές θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια ως μέθοδοι σύγκρισης με αυτές που θα αναπτυχθούν στον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Επιπλέον, μέσω της ανάπτυξης των μεθόδων στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης πραγματοποιήθηκαν:

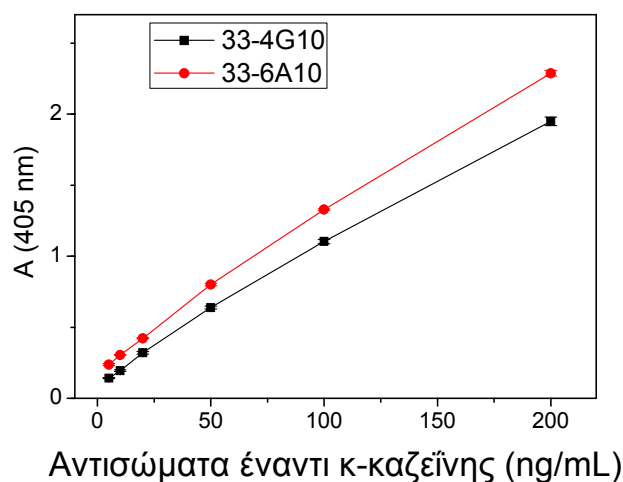
- επιλογή των ειδικών αντισωμάτων έναντι των τεσσάρων αλλεργιογόνων και προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσή τους
- προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης αλλεργιογόνων για ακινητοποίησή τους στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης
- επιλογή των ρυθμιστικών διαλυμάτων ακινητοποίησης, αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων και ανοσοαντίδρασης
- μελέτη της επίδρασης της προεπάσης των προτύπων διαλυμάτων των αλλεργιογόνων με τα ειδικά έναντι αυτών αντισώματα στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης
- μελέτη της χρονικής διάρκειας των ανοσοαντιδράσεων καθώς και της αντίδρασης με τα αντισώματα έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού ή/και κουνελιού

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών πραγματοποιήθηκε με κριτήριο την επάρκεια του αναλυτικού σήματος και την ευαισθησία των αντίστοιχων καμπυλών βαθμονόμησης. Επιπλέον, ελήφθη μέριμνα ώστε να επιλεγούν κοινές συνθήκες για όλα τα αλλεργιογόνα με σκοπό να εφαρμοστούν κατά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους με οπτικό ανοσοαισθητήρα.

7.1.1 Επιλογή των ειδικών αντισωμάτων έναντι των τεσσάρων αλλεργιογόνων καθώς και βελτιστοποίηση της συγκέντρωσής τους- Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσής του ακινητοποιημένου αλλεργιογόνου

κ-καζεΐνη

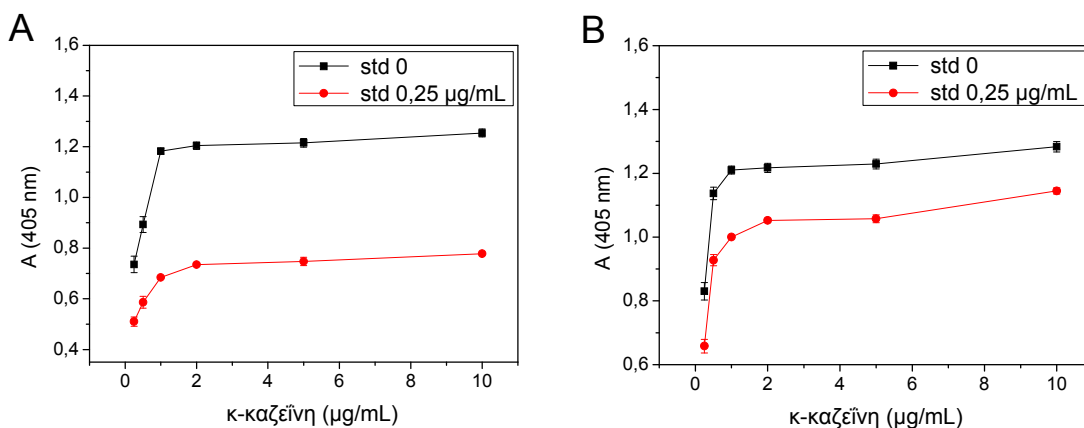
Οι κύριες παράμετροι που καθορίζουν το αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία ανίχνευσης ενός ανοσοχημικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου είναι η συγκέντρωση της ακινητοποιημένης αλλεργιογόνου πρωτεΐνης στα φρεάτια μικροτιλοδότησης και η συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων. Στα πλαίσια της ανάπτυξης του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης ελέγχθηκαν δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, 33-4G10 και 33-6A10, σε συνδυασμό με διαφορετικές συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης για ακινητοποίηση στα φρεάτια. Στο σχήμα 1, παρουσιάζονται τα αναλυτικά σήματα που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης όταν η συγκέντρωση κ-καζεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης ήταν 10 µg/mL, ενώ οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κυμαίνονταν από 5 έως 200 ng/mL.



Σχήμα 1: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 33-4G10 (■) και 33-6A10 (●). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως φαίνεται για τη δεδομένη συγκέντρωση κ-καζεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης, επαρκές αναλυτικό σήμα (τιμές οπτικής απορρόφησης ίσες ή μεγαλύτερες από 1,0) λαμβάνεται και με τα δύο αντισώματα όταν χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση \geq 100 ng/mL.

Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών, χρησιμοποιώντας για κάθε αντίσωμα συγκέντρωση 100 ng/mL προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση κ-καζεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης. Οι συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης που ελέγχθηκαν κυμαίνονταν από 0,25 έως 10 µg/mL. Στο σχήμα 2, παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν τόσο για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα όσο και για πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 250 ng/mL με τα δύο διαφορετικά αντισώματα.

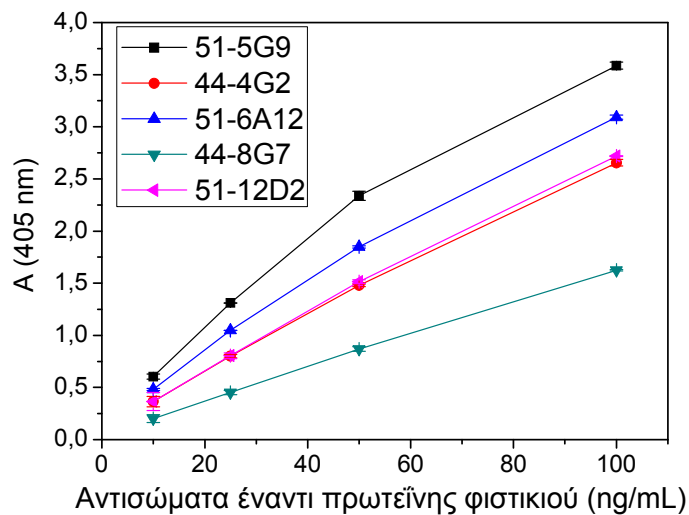


Σχήμα 2: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο (■) και για το πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 250 ng/mL (●) με το αντίσωμα: **A) 33-4G10, και B) 33-6A10** συναρτήσει της συγκέντρωσης της κ-καζεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Όπως φαίνεται στο σχήμα, μέγιστες τιμές οροφής επιτεύχθηκαν και με τα δύο αντισώματα (33-4G10 και 33-6A10) για συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης ίσες ή μεγαλύτερες από 1 µg/mL. Ως προς την ευαισθησία ανίχνευσης (εκτόπιση που αντιστοιχεί σε διάλυμα κ-καζεΐνης 250 ng/mL), για το αντίσωμα 33-4G10 δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές για συγκεντρώσεις καζεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης από 1 έως 10 µg/mL, ενώ για το αντίσωμα 33-6A10 παρατηρήθηκε αρνητική επίδραση στην ευαισθησία ανίχνευσης για συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης >2 µg/mL. Και για τα δύο αντισώματα, η μεγαλύτερη ποσοστιαία πτώση παρουσία του προτύπου κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 250 ng/mL επιτεύχθηκε για συγκέντρωση διαλύματος κ-καζεΐνης για την επικάλυψη των φρεατίων μικροπιλοδότησης ίση με 1 µg/mL. Ως εκ τούτου αυτή η συγκέντρωση σε συνδυασμό με συγκέντρωση 100 ng/mL για το αντίσωμα 33-4G10 επιλέχθηκαν για τα επόμενα πειράματα.

Πρωτεΐνη φιστικιού

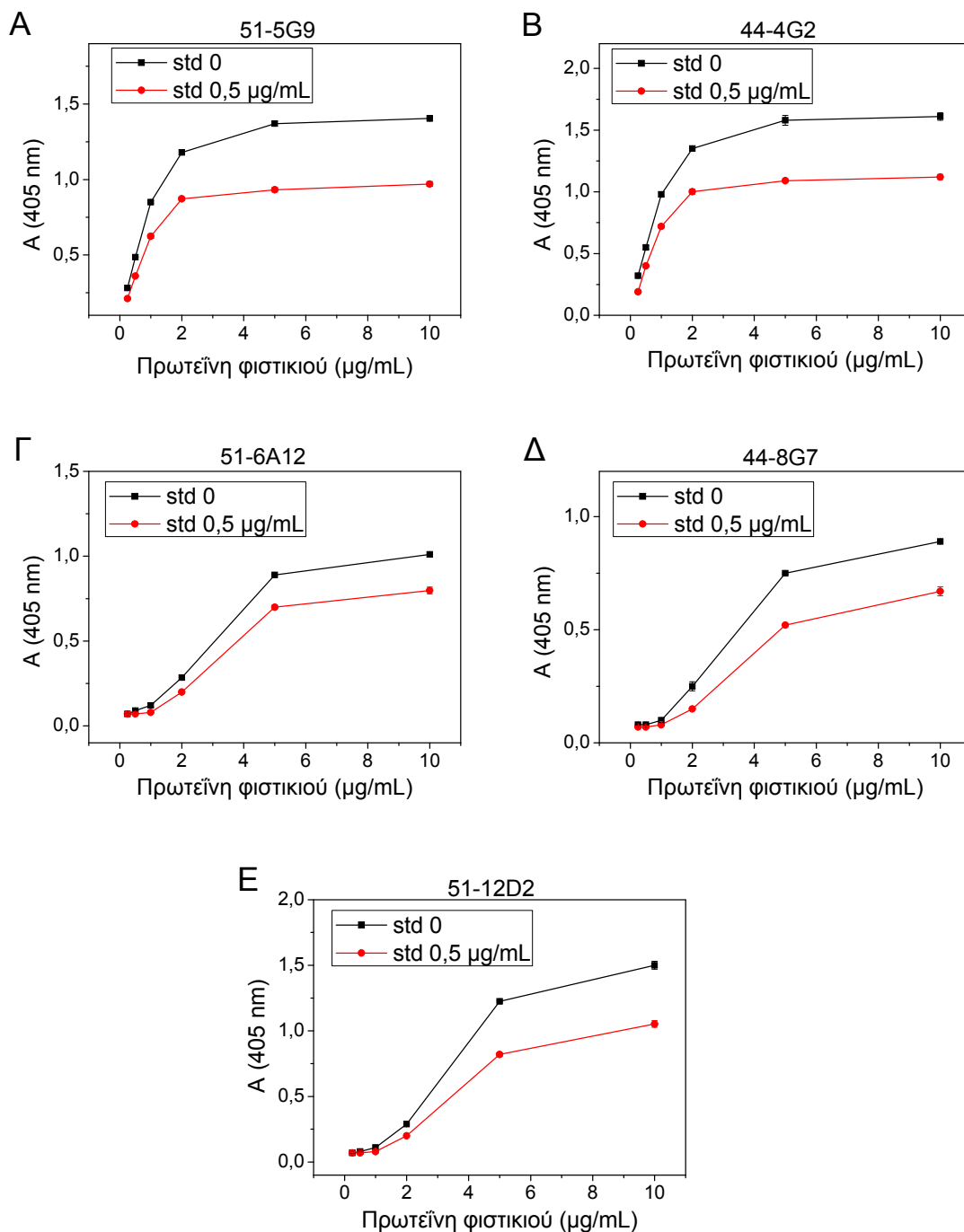
Για την ανάπτυξη του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου για την πρωτεΐνη φιστικιού ελέγχθηκαν πέντε μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, 51-6A12, 44-8G7, 51-5G9, 44-4G2, 51-12D2. Όπως και στην περίπτωση της κ-καζεΐνης, για την επίτευξη υψηλού αναλυτικού σήματος και ικανοποιητικής ευαισθησίας ανίχνευσης εξετάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης και καθενός από τα πέντε μονοκλωνικά αντισώματα. Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται τα αναλυτικά σήματα που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης φιστικιού όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης ήταν 10 µg/mL για συγκεντρώσεις αντισωμάτων από 10 έως 100 ng/mL.



Σχήμα 3: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης φιστικιού συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 51-5G9 (■), 44-4G2 (●), 51-6A12 (▲), 44-8G7 (▼) και 51-12D2 (◄). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως φαίνεται από το σχήμα, για τη δεδομένη συγκέντρωση πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης, επαρκές αναλυτικό σήμα λαμβάνεται για όλα τα αντισώματα όταν χρησιμοποιούνται σε εύρος συγκεντρώσεων από 25 έως 50 ng/mL. Έτσι χρησιμοποιώντας συγκέντρωση 25 ng/mL για το 51-5G9 και το 51-6A12, και 50 ng/mL για το 44-8G7, το 51-12D2 και το 44-4G2 προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης. Οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης φιστικιού που ελέγχθηκαν κυμαίνονταν από 0,25 έως 10 µg/mL. Στο σχήμα 4, παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που

ελήφθησαν τόσο για μηδενικό πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης φιστικιού όσο και για πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 500 ng/mL για καθένα από τα πέντε αντισώματα.



Σχήμα 4: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο (■) και για το πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης φιστικιού συγκέντρωσης 250 ng/mL (●) με το αντίσωμα: Α) 51-5G9, Β) 44-4G2, Γ) 51-6A12, Δ) 44-8G7 και Ε) 51-12D2, συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

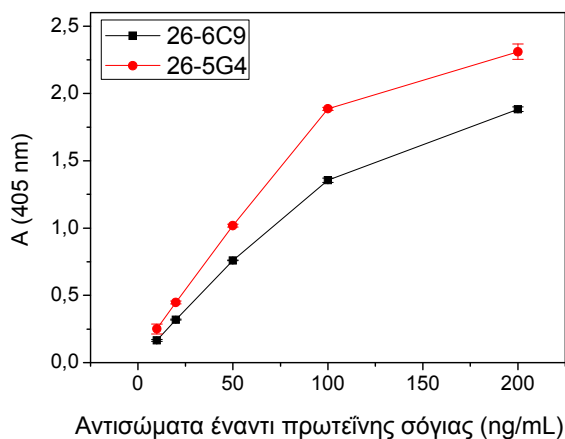
Σύμφωνα με το σχήμα 4, για το αντίσωμα 51-5G9, αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης από 0,25 σε 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, όπου και επιτεύχθηκαν μέγιστες τιμές οροφής, είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του σήματος περίπου 5 φορές, ενώ η ευαισθησία ανίχνευσης (εκτόπιση για πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 500 ng/mL) παρουσίασε μικρή βελτίωση για συγκεντρώσεις πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης από 5 έως 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Παρόμοια αποτελέσματα τόσο ως προς το αναλυτικό σήμα όσο και ως προς την ευαισθησία ανίχνευσης ελήφθησαν και για το αντίσωμα 44-4G2. Για τα αντισώματα 51-6A12, 44-8G7 και 51-12D2 παρατηρήθηκε συνεχής αύξηση του σήματος για συγκέντρωση πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης μέχρι 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, χωρίς να επιτευχθούν μέγιστες τιμές οροφής. Ως προς την ευαισθησία ανίχνευσης, για τα αντισώματα 51-6A12 και 44-8G7, η ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος παρουσία του προτύπου ήταν μικρότερη συγκριτικά με εκείνη που ελήφθη χρησιμοποιώντας τα αντισώματα 51-5G9 και 44-4G2, ενώ για το αντίσωμα 51-12D2, η ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ήταν σχετικά μεγαλύτερη όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης φιστικιού στο διάλυμα ακινητοποίησης ήταν 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ από εκείνη που προέκυψε για συγκέντρωση 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (64% και 69%, αντίστοιχα). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα αντισώματα 51-5G9, 44-4G2 και 51-12D2 παρείχαν επαρκές αναλυτικό σήμα, ενώ το αντίσωμα 51-12D2 παρείχε την υψηλότερη ευαισθησία ανίχνευσης σε σχέση με τα άλλα δύο αντισώματα. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε για τα επόμενα πειράματα.

Πρωτεΐνη σόγιας

Για την ανάπτυξη ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου για την πρωτεΐνη σόγιας ελέγχθηκαν δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, 26-6C9 και 26-5G4. Όπως και προηγουμένως, εξετάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί συγκεντρώσεων πρωτεΐνης σόγιας στο διάλυμα ακινητοποίησης και καθενός από τα δύο μονοκλωνικά αντισώματα. Στο σχήμα 5 παρουσιάζονται τα αναλυτικά σήματα που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιώντας συγκέντρωση πρωτεΐνης σόγιας 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ στο διάλυμα ακινητοποίησης και συγκεντρώσεις αντισωμάτων που κυμαίνονταν από 10 έως 200 ng/mL .

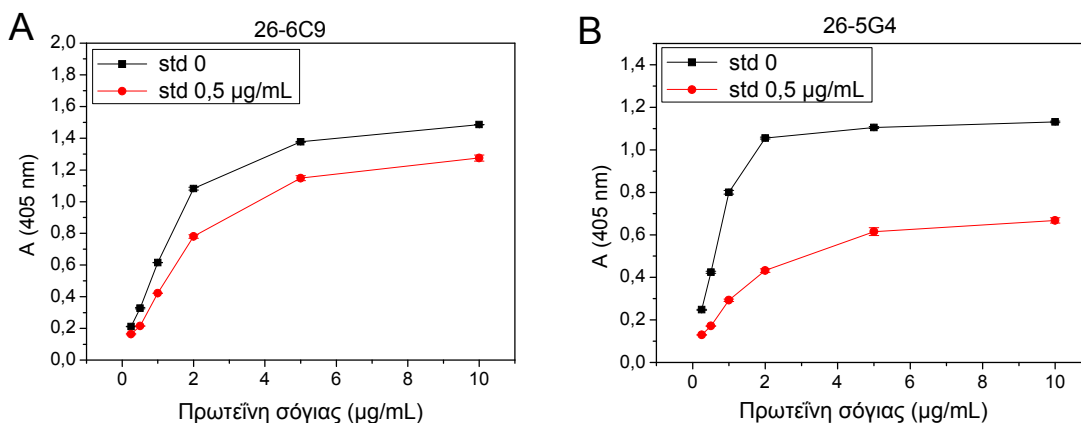
Όπως φαίνεται στο σχήμα, για τη δεδομένη συγκέντρωση πρωτεΐνης σόγιας στο διάλυμα ακινητοποίησης, επαρκές αναλυτικό σήμα λαμβάνεται για συγκέντρωση του αντισώματος 26-6C9 ίση ή μεγαλύτερη από 75 ng/mL και για το αντίσωμα 26-5G4 για συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη από 50 ng/mL . Έτσι, ο προσδιορισμός

της βέλτιστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης σόγιας στο διάλυμα ακινητοποίησης πραγματοποιήθηκε για συγκέντρωση 50 ng/mL για το 26-5G4 και 75 ng/mL για το 26-6C9. Οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης σόγιας που ελέγχθηκαν κυμαίνονταν από 0,25 έως 10 µg/mL.



Σχήμα 5: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για μηδενικό πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης σόγιας συναρτήσει της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 26-6C9 (■) και 26-5G4 (●). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Στο σχήμα 6, παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν τόσο για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα όσο και για πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης σόγιας συγκέντρωσης 500 ng/mL με τα δύο αντισώματα.



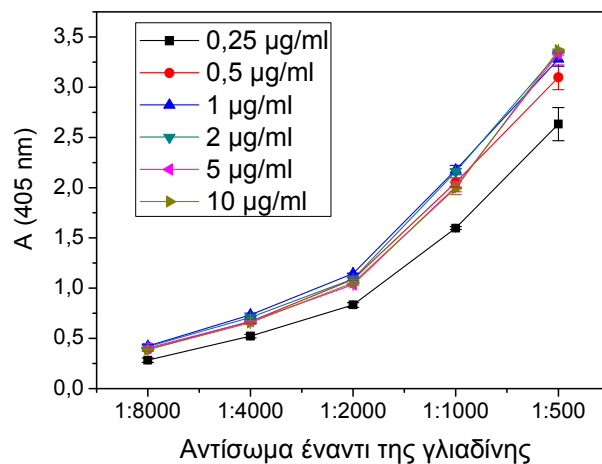
Σχήμα 6: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο (■) και για πρότυπο διάλυμα πρωτεΐνης σόγιας συγκέντρωσεως 250 ng/mL (●) με το αντισώμα: A) 26-6C9, και B) 26-5G4 συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σόγιας στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Σύμφωνα με το σχήμα 6, επαρκές αναλυτικό σήμα ελήφθη για συγκεντρώσεις πρωτεΐνης σόγιας στο διάλυμα ακινητοποίησης ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ μέγιστες τιμές οροφής ελήφθησαν και για τα δύο αντισώματα για συγκεντρώσεις ≥ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Πιο συγκεκριμένα, για το αντίσωμα 26-6C9 η βέλτιστη ευαισθησία ανίχνευσης παρατηρήθηκε όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σόγιας στο διάλυμα ακινητοποίησης ήταν 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (~72%) ενώ για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, η ποσοστιαία πτώση του σήματος παρουσία προτύπου συγκεντρώσεως 500 ng/mL μειωνόταν κατά ~10%. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και για το αντίσωμα 26-5G4, με την βέλτιστη ευαισθησία να επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σόγιας στο διάλυμα ακινητοποίησης ήταν 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ευαισθησία ανίχνευσης ~40%). Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, επιλέχθηκε συγκέντρωση 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ της πρωτεΐνης σόγιας στο διάλυμα ακινητοποίησης σε συνδυασμό με το αντίσωμα 26-6C9 το οποίο παρείχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές ποσοστιαίας εκτόπισης σε σχέση με το αντίσωμα 26-6C9.

Γλιαδίνη

Για την ανάπτυξη ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου για την γλιαδίνη ελέγχθηκε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού, G-9144. Εξετάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί συγκεντρώσεων γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης και πολυκλωνικού αντισώματος κατά της γλιαδίνης. Στο σχήμα 7 παρουσιάζονται τα αναλυτικά σήματα που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης για συγκεντρώσεις γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης από 0,25 έως 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και συγκεντρώσεις αντισώματος από 1:8000 έως 1:500.

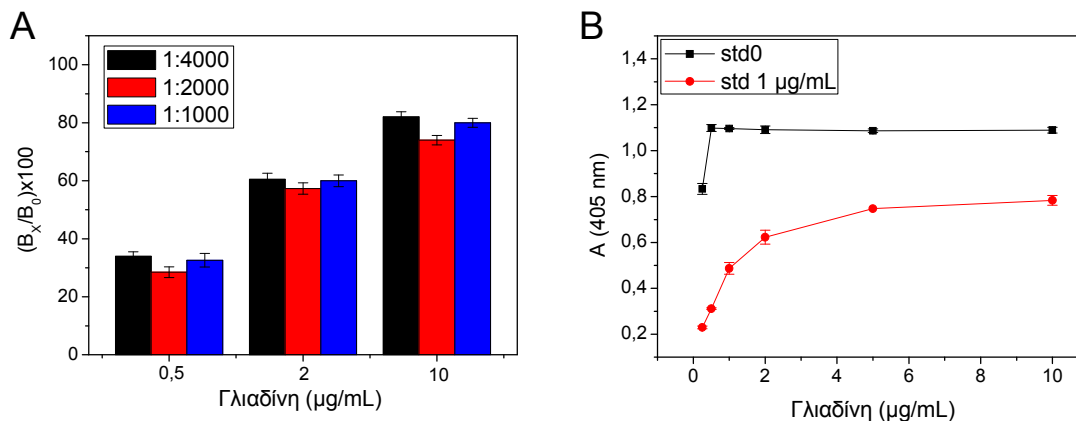
Όπως προκύπτει από το σχήμα επαρκές αναλυτικό σήμα λαμβάνεται όταν χρησιμοποιείται συγκέντρωση γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης $\geq 0,5$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε συνδυασμό με συγκέντρωση αντισώματος έναντι της γλιαδίνης $\geq 1:2000$ οπότε και επιτυγχάνονται μέγιστες τιμές οροφής. Πέραν του αναλυτικού σήματος, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης για αραίωση αντισώματος 1:2000 στην ευαισθησία ανίχνευσης.



Σχήμα 7: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος G-9144 και για τις συγκεντρώσεις γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης: 0,25 µg/mL (■), 0,5 µg/mL (●), 1 µg/mL (▲), 2 µg/mL (▼), 5 µg/mL (◄) και 10 µg/mL (►). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Στο σχήμα 8A παρουσιάζεται η επί τοις εκατό ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος παρουσία προτύπου διαλύματος γλιαδίνης συγκεντρώσεως 1 µg/mL, ενδεικτικά με τρεις διαφορετικές αραιώσεις του ειδικού αντισώματος (1:1000, 1:2000 και 1:4000) για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης (0,5, 2 και 10 µg/mL). Στο σχήμα 8B παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν τόσο με το μηδενικό πρότυπο διάλυμα όσο και με πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης συγκέντρωσης 1 µg/mL, για συγκεντρώσεις γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης που κυμαινόταν από 0,25 έως 1 µg/mL.

Από το σχήμα 8 προκύπτει ότι η ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος παρουσία προτύπου μειωνόταν αυξανόμενης της συγκέντρωσης γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης. Βάσει τόσο του αναλυτικού σήματος (~1,1) όσο και της ευαισθησίας ανίχνευσης (~29%) επιλέχθηκε συγκέντρωση 0,5 µg/mL γλιαδίνης για την κάλυψη φρεατίων μικροπιλοδότησης σε συνδυασμό με αραιώση του πολυκλωνικού αντισώματος G-9144 1:2000 για τα επόμενα πειράματα.



Σχήμα 8: A) Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης συγκεντρώσεως 1 µg/mL ως προς το μηδενικό πρότυπο για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισώματος G-9144 σε συνδυασμό με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις γλιαδίνης στο διάλυμα ακινητοποίησης. B) Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο (■) και για πρότυπο διάλυμα συγκεντρώσεως γλιαδίνης 1 µg/mL (●) για αραιώση του αντισώματος G9144 1:2000. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

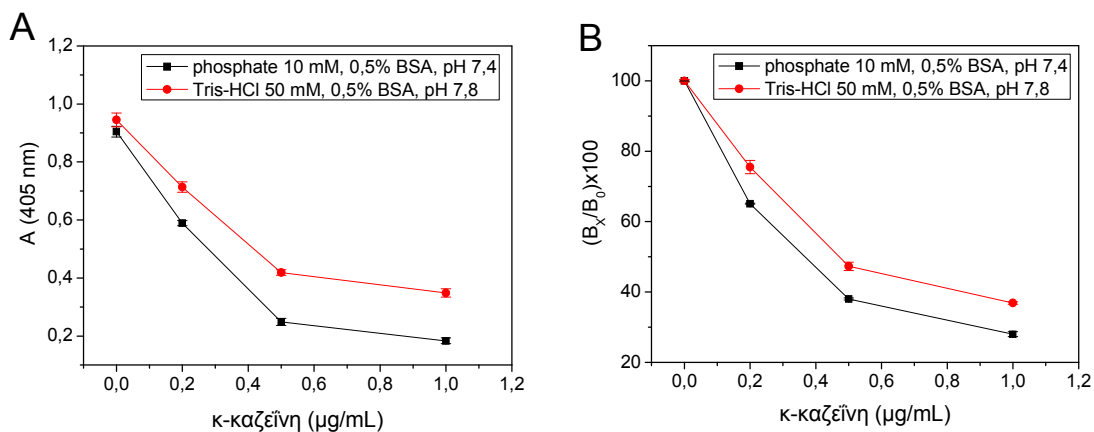
7.1.2 Βελτιστοποίηση σύνθεσης διαλυμάτων ανοσοενζυμικού προσδιορισμού της βοείου κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης

Βελτιστοποιήθηκαν η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοαντίδρασης, του διαλύματος έκπλυσης, του διαλύματος ακινητοποίησης και του διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων χρησιμοποιώντας τις συγκεντρώσεις των ανοσοαντιδραστηρίων που επιλέχθηκαν στο εδάφιο 7.1.1.

Ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης

Για την επιλογή της σύστασης του διαλύματος ανοσοαντίδρασης ελέγχθηκαν τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα: 1) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl και 2) Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl. Και στις δύο περιπτώσεις ως διάλυμα ακινητοποίησης της εκάστοτε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9,25, ενώ ως διάλυμα αποκλεισμού των ελευθέρων

θέσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα όξινων ανθρακικών 0,1 M, pH 8,5 που περιείχε 1% (β/ο) BSA. Η βέλτιστη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοαντίδρασης επιλέχθηκε βάσει της τιμής του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα καθώς και των τιμών που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα αλλεργιογόνων πρωτεϊνών συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL για την κ-καζεΐνη, 250, 1000 και 2000 ng/mL για την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας, και 250, 500 και 1000 ng/mL για τη γλιαδίνη. Στο σχήμα 9 A και 9B παρουσιάζονται ενδεικτικά οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης και για τα τρία πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης χρησιμοποιώντας τα δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα και οι αντίστοιχες τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης.

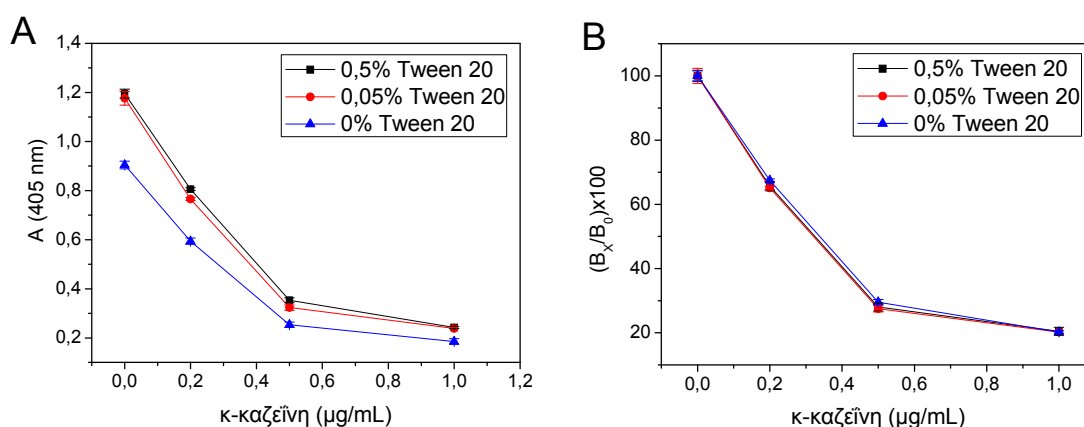


Σχήμα 9: Α) Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 0, 200, 500 και 1000 ng/mL όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl (■) και Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl (●). Β) Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL με τα δύο διαλύματα ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Από το σχήμα προκύπτει ότι με χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl ως διαλύματος ανοσοαντίδρασης, επιτυγχάνεται παρεμφερές αναλυτικό σήμα αλλά μεγαλύτερη ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης της κ-καζεΐνης σε σχέση με το διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl.

Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και για την πρωτεΐνη φιστικιού και σόγιας, ενώ στην περίπτωση της γλιαδίνης δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο αναλυτικό σήμα και στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησής για τα δύο διαλύματα ανοσοαντίδρασης. Το σήμα μη ειδικής δέσμευσης για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες ήταν πολύ μικρό και για τα δύο διαλύματα ανοσοαντίδρασης. Για το λόγο αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl επιλέχθηκε για περαιτέρω πειραματισμό.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης του επιφανειοδραστικού αντιδραστήριου Tween 20 στο διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Στο σχήμα 10A παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL, με προσθήκη 0,05% (ο/ο) και 0,5% (ο/ο) καθώς και χωρίς τη προσθήκη Tween 20, ενώ στο σχήμα 10B παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης.



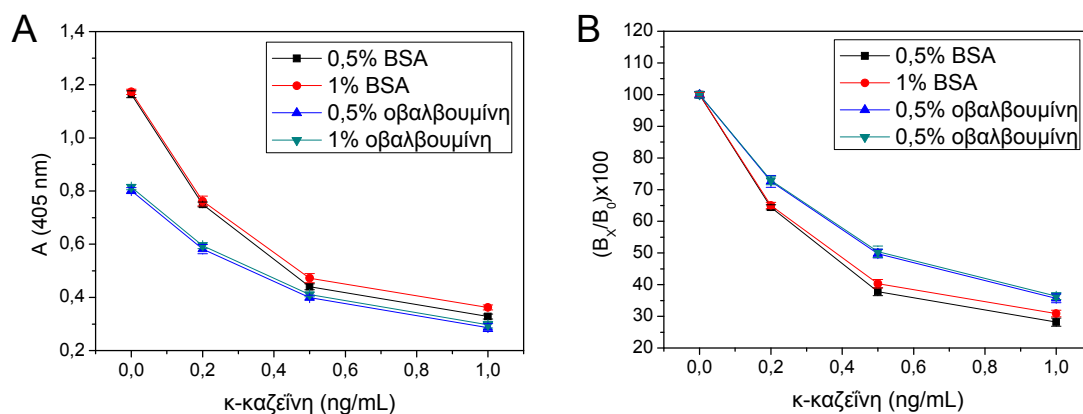
Σχήμα 10: A) Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο και για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA και 0,9% (β/ο) NaCl χωρίς Tween 20 (■), το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με 0,05% (ο/ο) Tween 20 (●) και το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα με 0,5% (ο/ο) Tween 20 (▲). **B)** Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL για τα τρία διαλύματα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν στο σχήμα 10, η προσθήκη του Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης προκαλεί αύξηση του αναλυτικού σήματος (~25%), χωρίς να επηρεάζει την ευαισθησία ανίχνευσης της

καμπύλης βαθμονόμησης της κ-καζεΐνης. Η αύξηση της ποσοστιαίας περιεκτικότητας του ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε Tween 20, από 0,05% σε 0,5% δεν είχε καμία επίδραση τόσο στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία ανίχνευσης της καμπύλης βαθμονόμησης της κ-καζεΐνης. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για την πρωτεΐνη σόγιας και τη γλιαδίνη. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης φιστικιού, η προσθήκη του Tween 20 οδηγούσε σε ακόμα μεγαλύτερη αύξηση του αναλυτικού σήματος (~35%). Για το λόγο αυτό, το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,5% (β/ο) BSA, 0,9% (β/ο) NaCl και 0,05% Tween 20 (ο/ο) επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη.

Μία παράμετρος που επίσης διερευνήθηκε σε σχέση με τη σύσταση του διαλύματος ανοσοαντίδρασης ήταν το είδος και την περιεκτικότητα της φέρουσας πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,9% (β/ο) NaCl, 0,05% Tween 20 και: 1) 0,5% (β/ο) BSA, 2) 1% (β/ο) BSA, 3) 0,5% (β/ο) οαλβουμίνη και 4) 1% (β/ο) οαλβουμίνη και προσδιορίστηκε η επίδρασή τους τόσο στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία ανίχνευσης των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών. Στο σχήμα 11A παρουσιάζεται το αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και τα πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL, με τα τέσσερα ρυθμιστικά διαλύματα ανοσοαντίδρασης, ενώ στο σχήμα 11B παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης. Όπως φαίνεται στο σχήμα 11A, το αναλυτικό σήμα που ελήφθη με τα διαλύματα που περιείχαν BSA ήταν ~30% μεγαλύτερο σε σχέση με εκείνο που ελήφθη με το διάλυμα που περιείχε οαλβουμίνη. Επιπλέον, η βέλτιστη ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης της κ-καζεΐνης ελήφθη με το ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε BSA. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και την πρωτεΐνη φιστικιού, τη πρωτεΐνη σόγιας και τη γλιαδίνη. Η αύξηση της ποσοστιαίας περιεκτικότητας του διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε BSA δεν επηρέαζε ιδιαίτερα το αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Αντίθετα, για την πρωτεΐνη φιστικιού, τη σόγια και τη γλιαδίνη η αύξηση της ποσοστιαίας περιεκτικότητας του διαλύματος σε BSA από 0,5% σε 1% (β/ο), οδηγούσε σε 20% αύξηση του αναλυτικού σήματος, ενώ η ευαισθησία των καμπυλών βαθμονόμησης παρέμενε αμετάβλητη.

Βάσει όλων των παραπάνω αποτελεσμάτων το διάλυμα ανοσοαντίδρασης που τελικά επιλέχθηκε ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,9% (β/ο) NaCl, 0,05% (ο/ο) Tween 20 και 1% (β/ο) BSA.



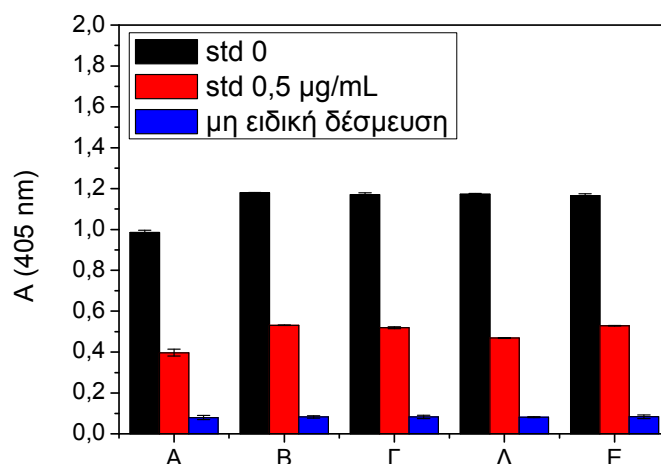
Σχήμα 11: A) Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο και για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10 mM, pH 7,4 που περιέχει 0,9% (β/ο) NaCl με 0,05% (ο/ο) Tween 20 και: 0,5% (β/ο) BSA (■), 1% (β/ο) BSA (●), 0,5% (β/ο) οβαλβουμίνη (▲) ή 1% (β/ο) οβαλβουμίνη (▼). **B)** Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 200, 500 και 1000 ng/mL με τα ανωτέρω διαλύματα ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος εκπλύσεων βελτιστοποιήθηκε κυρίως ως προς την περιεκτικότητά του σε επιφανειοδραστικό Tween 20. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης 0,05% (ο/ο) Tween 20 στο διάλυμα έκπλυσης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,9% (β/ο) NaCl), τόσο ως προς το αναλυτικό σήμα του μηδενικού προτύπου όσο και ως προς το αναλυτικό σήμα μη ειδικής δέσμευσης. Για τον σκοπό αυτό, συγκρίθηκαν οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν από φρεάτια μικροπιλοδότησης στα οποία οι εκπλύσεις είχαν πραγματοποιηθεί με διάλυμα που δεν περιείχε Tween 20 με εκείνες που ελήφθησαν από φρεάτια που είχαν εκπλυθεί με διάλυμα που περιείχε 0,05% (ο/ο) Tween 20 μετά από: i) την ακινητοποίηση της αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, ii) τον αποκλεισμό των ελευθέρων θέσεων των φρεατίων μικροπιλοδότησης, iii) την ανοσοαντίδραση ή iv) την αντίδραση με το δεύτερο αντίσωμα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη παρουσιάζονται στο σχήμα 36, όπου απεικονίζονται ενδεικτικά οι τιμές οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούν στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης, το σήμα του μηδενικού πρότυπου

διαλύματος καθώς και προτύπου διαλύματος κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 500 ng/mL.



Σχήμα 12: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης (■), το πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης 500 ng/mL (●) και τη μη ειδική δέσμευση (▲) όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με: A) ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς Tween 20 σε όλα τα στάδια ανοσοπροσδιορισμού, B) ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,05% (o/o) Tween 20 σε όλα τα στάδια μετά την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης, Γ) ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,05% (o/o) Tween 20 σε όλα τα στάδια μετά τον αποκλεισμό των ελευθέρων θέσεων, Δ) ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,05% (o/o) Tween 20 σε όλα τα στάδια μετά την ανοσοαντίδραση και E) ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,05% (o/o) Tween 20 στο στάδιο μετά την επώαση με το διάλυμα του δευτέρου αντισώματος. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 12, η προσθήκη του Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης οδηγεί σε αύξηση του αναλυτικού σήματος περίπου κατά 15%, όταν το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται σε όλα τα στάδια της ανοσοανάλυσης, ενώ δεν παρατηρείται καμία επίδραση στην τιμή του σήματος μη ειδικής δέσμευσης. Επίσης, βρέθηκε ότι η ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης βελτιώθηκε όταν η πραγματοποιήθηκε έκπλυση με διάλυμα που περιείχε Tween 20 μετά την ανοσοαντίδραση. Αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και για τη γλιαδίνη, ενώ στην περίπτωση της πρωτεΐνης σόγιας και της πρωτεΐνης φιστικιού δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της έκπλυσης με διάλυμα που περιείχε Tween 20 μετά από κάθε στάδιο του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού. Για το λόγο υιοθετήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,9% (β/o) NaCl, για τις εκπλύσεις πριν το στάδιο της ανοσοαντίδρασης, και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM,

pH 7,4 που περιείχε 0,9% (β/ο) NaCl και 0,05% (ο/ο) Tween 20 για εκπλύσεις μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης.

Μετά την επιλογή του διαλύματος ανοσοαντίδρασης βελτιστοποιήθηκαν τόσο το διάλυμα ακινητοποίησης όσο και το διάλυμα αποκλεισμού των ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων μικροτιλοδότησης χρησιμοποιώντας το διάλυμα ανοσοαντίδρασης καθώς και τις συγκεντρώσεις ανοσοαντιδραστηρίων που επιλέχθηκαν στα εδάφια 7.1.1 και 7.1.2.

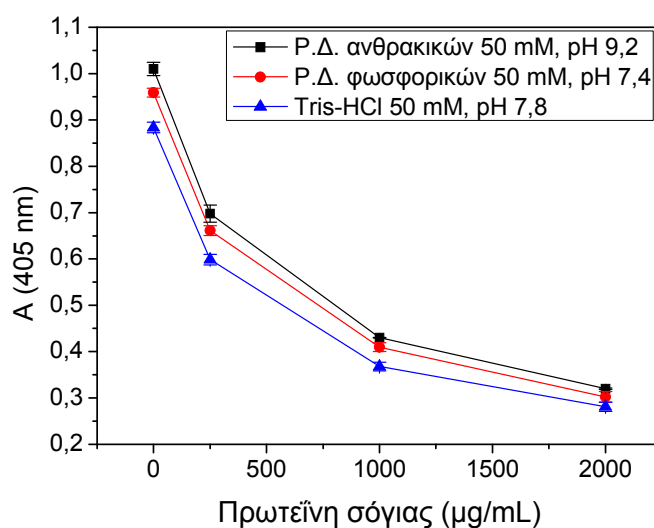
Διάλυμα ακινητοποίησης

Για την ακινητοποίηση των τεσσάρων αλλεργιογόνων στα φρεάτια μικροτιλοδότησης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: 1 μg/mL κ-καζεΐνης, 5 μg/mL πρωτεΐνης φιστικιού, 2 μg/mL πρωτεΐνης σόγιας και 0,5 μg/mL γλιαδίνης σε τρία διαφορετικά διαλύματα ακινητοποίησης:

1. ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4
2. ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9,2
3. ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8

Στο σχήμα 13 παρουσιάζεται το αναλυτικό σήμα που ελήφθη ενδεικτικά για το μηδενικό πρότυπο της πρωτεΐνης σόγιας καθώς και για πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 250, 100 και 2000 ng/mL με τα τρία διαλύματα ακινητοποίησης.

Όπως φαίνεται, το διάλυμα που παρείχε το βέλτιστο αναλυτικό σήμα ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9,2 ενώ η ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης δεν επηρεαζόταν από τη σύσταση του διαλύματος ακινητοποίησης. Αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και για την πρωτεΐνη φιστικιού. Για την κ-καζεΐνη και τη γλιαδίνη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο αναλυτικό σήμα καθώς και την ευαισθησία ανίχνευσης μεταξύ των διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων. Ως εκ τούτου, το ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9,2, υιοθετήθηκε ως διάλυμα ακινητοποίησης στο τελικό πρωτόκολλο ανοσοενζυμικού προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών.



Σχήμα 13: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης σόγιας συγκέντρωσης 250, 100 και 2000 ng/mL πρωτεΐνης σόγιας όταν ως διάλυμα ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκε: ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9,2 (■), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4 (●), ή ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων μικροτιτλοδότησης

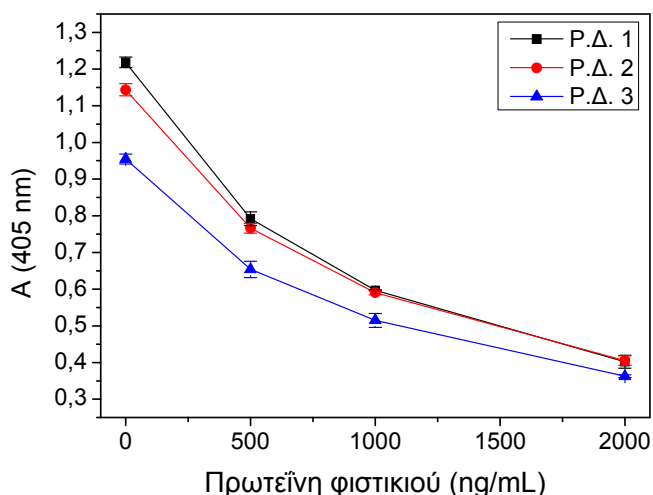
Στα πλαίσια της ανάπτυξης ανοσοενζυμικού προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών μελετήθηκε η επίδραση του διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων τόσο στο αναλυτικό σήμα και το σήμα μη ειδικής δέσμευσης όσο και στην ευαισθησία των καμπυλών βαθμονόμησης. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5, 1% BSA (β/ο) (P.Δ. 1)
2. ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, 1% BSA (β/ο) (P.Δ. 2)
3. ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, 1% BSA (β/ο) (P.Δ. 3)

Στο σχήμα 14 παρουσιάζεται ενδεικτικά το αναλυτικό σήμα που ελήφθη χρησιμοποιώντας τα τρία διαφορετικά διαλύματα αποκλεισμού για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης του φιστικιού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, βέλτιστο αναλυτικό σήμα και βέλτιστη ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης ελήφθη χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5, 1% BSA (β/ο). Το αναλυτικό σήμα με ειδικής

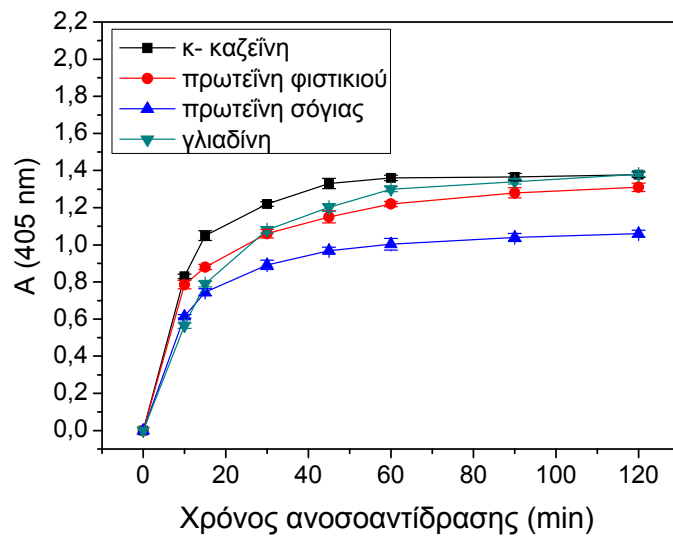
δέσμευσης ήταν <0,08 και για τα τρία διαφορετικά διαλύματα. Παρεμφερή αποτελέσματα ελήφθησαν και για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη σόγιας και τη γλιαδίνη.



Σχήμα 14: Καμπύλες βαθμονόμησης πρωτεΐνης φιστικιού που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ως διάλυμα αποκλεισμού: ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 100 mM, pH 8,5, 1% BSA (β/ο) (P. Δ. 1) (■), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7,4, 1% BSA (β/ο) (P. Δ. 2) (●), ή ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, 1% BSA (β/ο) (P.Δ. 3) (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

7.1.3 Χρονική μελέτη ανοσοαντιδράσεων

Στο πλαίσιο της ανάπτυξης των ανοσοενζυμικών προσδιορισμών για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες ελέγχθηκε η επίδραση του χρόνου της ανοσοαντίδρασης τόσο στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης, χρησιμοποιώντας τις συνθήκες που επιλέχθηκαν στα εδάφια 7.1.1 και 7.1.2. Στο σχήμα 15 παρουσιάζεται η μεταβολή του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για τα μηδενικά πρότυπα διαλύματα των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών συναρτήσει του χρόνου ανοσοαντίδρασης. Η χρονική διάρκεια της αντίδρασης με τα επισημασμένα με HRP αντισώματα έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού ή κουνελιού ήταν 1 ώρα.



Σχήμα 15: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για τα μηδενικά πρότυπα διαλύματα καζεΐνης (■), πρωτεΐνης φιστικιού (●), πρωτεΐνης σόγιας (▲) και γλιαδίνης (▼) συναρτήσει της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

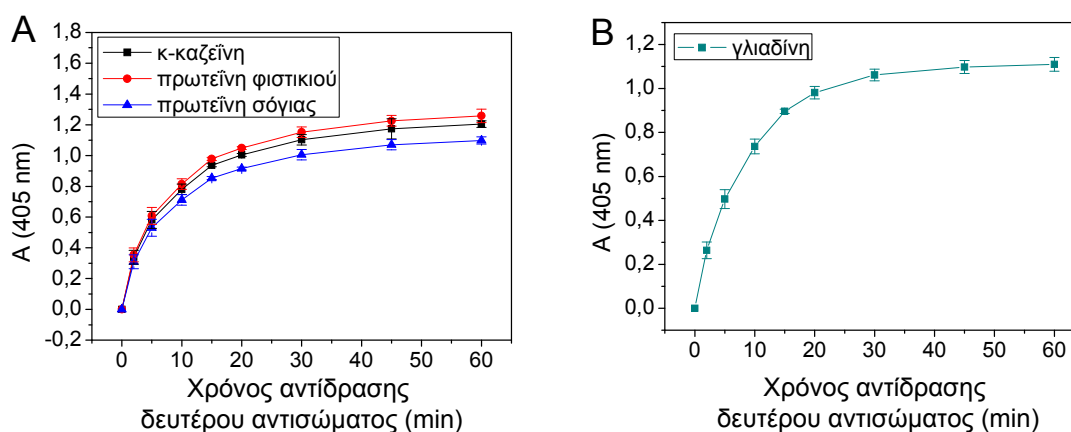
Σύμφωνα με το σχήμα 15, αύξηση του χρόνου ανοσοαντίδρασης οδηγεί σε αύξηση του αναλυτικού σήματος που λαμβάνεται για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και μέγιστες τιμές οροφής λαμβάνονται για χρόνο ≥ 60 min. Αναφορικά με την ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης, οι μεγαλύτερες τιμές ποσοστιαίας πτώσης του αναλυτικού σήματος για όλα τα πρότυπα διαλύματα ελήφθησαν για χρόνους ανοσοαντίδρασης 60 min. Ως εκ τούτου, αυτός ο χρόνος ανοσοαντίδρασης επιλέχθηκε για το τελικό πρωτόκολλο ανοσοενζυμικού προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης.

7.1.4 Χρονική μελέτη της αντίδρασης των αντισωμάτων έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού/κουνελιού με τα ειδικά αντισώματα έναντι των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών

Επιπλέον της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης, μελετήθηκε ο χρόνος αντίδρασης των αντισωμάτων έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού με τα ειδικά αντισώματα έναντι της κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, και της πρωτεΐνης

σόγιας, καθώς και του αντισώματος έναντι των γ -σφαιρινών κουνελιού με το ειδικό αντίσωμα έναντι της γλιαδίνης.

Στο σχήμα 16Α παρουσιάζεται η μεταβολή του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο της κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού και της πρωτεΐνης σόγιας συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ -σφαιρινών ποντικού με τα ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού έναντι καθεμίας από τις παραπάνω πρωτεΐνες. Στο σχήμα 16Β παρουσιάζεται η μεταβολή του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο γλιαδίνης συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ -σφαιρινών κουνελιού με το ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της γλιαδίνης που είχε αναπτυχθεί σε κουνέλι.

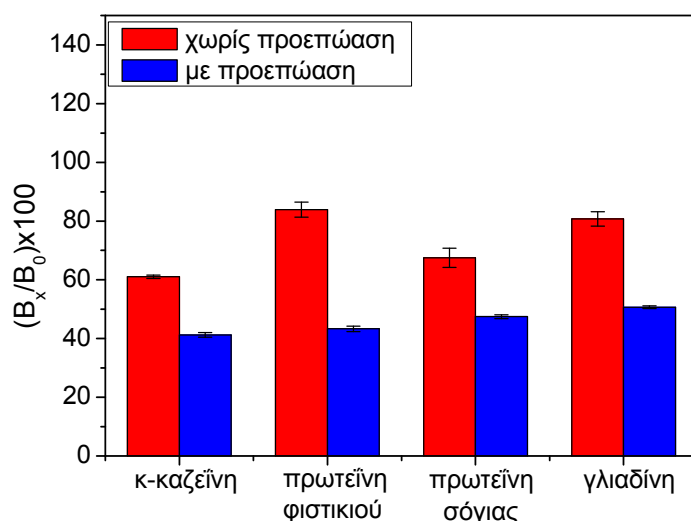


Σχήμα 16: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται **A)** για μηδενικά πρότυπα διαλύματα καζεΐνης (■), πρωτεΐνης φιστικιού (●), πρωτεΐνης σόγιας (▲), συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ -σφαιρινών ποντικού και **B)** για μηδενικό πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης (▼) συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ -σφαιρινών κουνελιού με τα ειδικά για κάθε αναλύτη αντισώματα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως προκύπτει από τα σχήματα, τιμές οροφής για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας εληφθήσαν για χρόνο αντίδρασης των δευτέρων αντισωμάτων με τα ειδικά έναντι των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών αντισώματα ≥ 45 min, ενώ για τη γλιαδίνη τιμές οροφής ελήφθησαν για χρόνο ≥ 30 min. Για το λόγο αυτό, υιοθετήθηκε ο χρόνος των 45 min στο τελικό πρωτόκολλο του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών.

7.1.5 Διερεύνηση επίδρασης της προεπώασης στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης

Μία επιπλέον παράμετρος που μελετήθηκε κατά την ανάπτυξη των ανοσοενζυμικών προσδιορισμών των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών ήταν η επίδραση της προεπώασης των προτύπων διαλυμάτων με τα ειδικά αντισώματα στην ευαισθησία των καμπυλών βαθμονόμησης. Για τη μελέτη αυτή ακινητοποιήθηκαν στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης κ-καζεΐνη συγκεντρώσεως 1 $\mu\text{g/mL}$, πρωτεΐνη φιστικιού 5 $\mu\text{g/mL}$, πρωτεΐνη σόγιας 2 $\mu\text{g/mL}$ και γλιαδίνη 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Παρασκευάστηκαν μίγματα προτύπων διαλυμάτων της καθεμίας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης με το διάλυμα του ειδικού αντισώματος κατά της κάθε πρωτεΐνης στις βέλτιστες συγκεντρώσεις (βλέπε εδάφιο 7.1.1). Τα μίγματα αυτά είτε προστέθηκαν απευθείας στα φρεάτια που είχαν επικαλυφθεί με την αντίστοιχη πρωτεΐνη χωρίς προεπώαση είτε είχαν προεπωαστεί για 60 min. Στο σχήμα 17 παρουσιάζεται η ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος που ελήφθη με και χωρίς προεπώαση για πρότυπα διαλύματα που περιείχαν: 0,10 $\mu\text{g/mL}$ κ-καζεΐνη, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ πρωτεΐνη φιστικιού, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ πρωτεΐνη σόγιας και 0,10 $\mu\text{g/mL}$ γλιαδίνη, αντίστοιχα.



Σχήμα 17: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 0,10 $\mu\text{g/mL}$ σε κ-καζεΐνη, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ σε πρωτεΐνη φιστικιού, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ σε πρωτεΐνη σόγιας και 0,10 $\mu\text{g/mL}$ σε γλιαδίνη ως προς τα αντίστοιχα μηδενικά πρότυπα διαλύματα όταν δεν έχει πραγματοποιηθεί προεπώαση των προτύπων διαλυμάτων με τα ειδικά έναντι των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών αντισώματα (κόκκινες

στήλης) και όταν έχει πραγματοποιηθεί προεπώαση για 60 min (μπλε στήλης). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

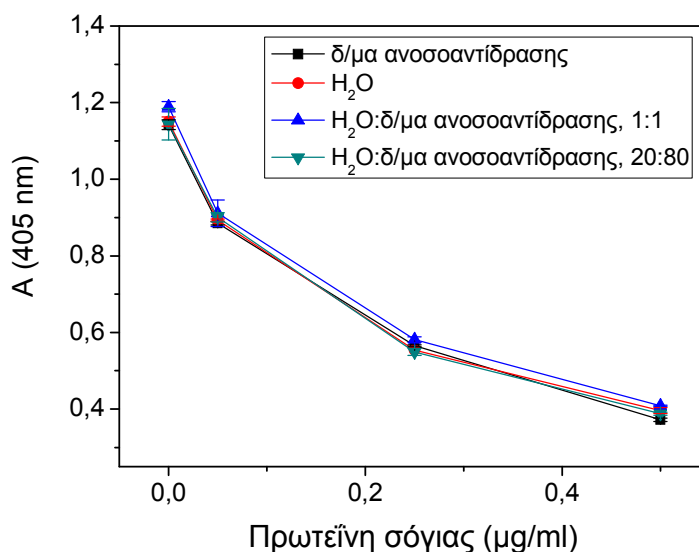
Όπως προκύπτει από το σχήμα, η προεπώαση των προτύπων διαλυμάτων των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με τα διαλύματα αντίστοιχων αντισωμάτων οδηγεί σε βελτίωση της ευαισθησίας της καμπύλης βαθμονόμησης και για τις τέσσερις πρωτεΐνες. Πιο αναλυτικά, για τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων που παρουσιάζονται στο σχήμα υπήρξε βελτίωση της επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης κατά 20% για την κ-καζεΐνη, 40% για την πρωτεΐνη φιστικιού, 20% για την πρωτεΐνη σόγιας και 30% για τη γλιαδίνη. Επιπλέον, η προεπώαση επέφερε σημαντική βελτίωση της επαναληψιμότητας των μετρήσεων εντός του προσδιορισμού στην περίπτωση της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης. Ως εκ τούτου, υιοθετήθηκε προεπώαση για 60 min στο τελικό πρωτόκολλο των ενζυμικών ανοσοπροσδιορισμών των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών.

7.1.6 Διερεύνηση της επίδρασης της μήτρας του δείγματος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό

Το μέσο που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των γραμμών παραγωγής στις βιομηχανίες τροφίμων είναι το πόσιμο νερό. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια της ανάπτυξης των ανοσοχημικών προσδιορισμών για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες διερευνήθηκε η επίδραση του νερού δικτύου στο απόλυτο σήμα και τη μορφή των καμπυλών βαθμονόμησης. Πιο αναλυτικά, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα για καθεμία από τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες σε νερό δικτύου, σε μίγμα νερού δικτύου/διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε αναλογία 20:80 και 50:50. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν συγκρίθηκαν τόσο ως προς το απόλυτο αναλυτικό σήμα για το μηδενικό πρότυπο όσο και ως προς την ευαισθησία των καμπυλών βαθμονόμησης με εκείνα που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα που είχαν παρασκευαστεί σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Στο σχήμα 18 παρουσιάζεται ενδεικτικά το αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο καθώς και πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 50, 250 και 500 ng/mL σε πρωτεΐνη σόγιας.

Σύμφωνα με το σχήμα, δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση του νερού δικτύου τόσο στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού και

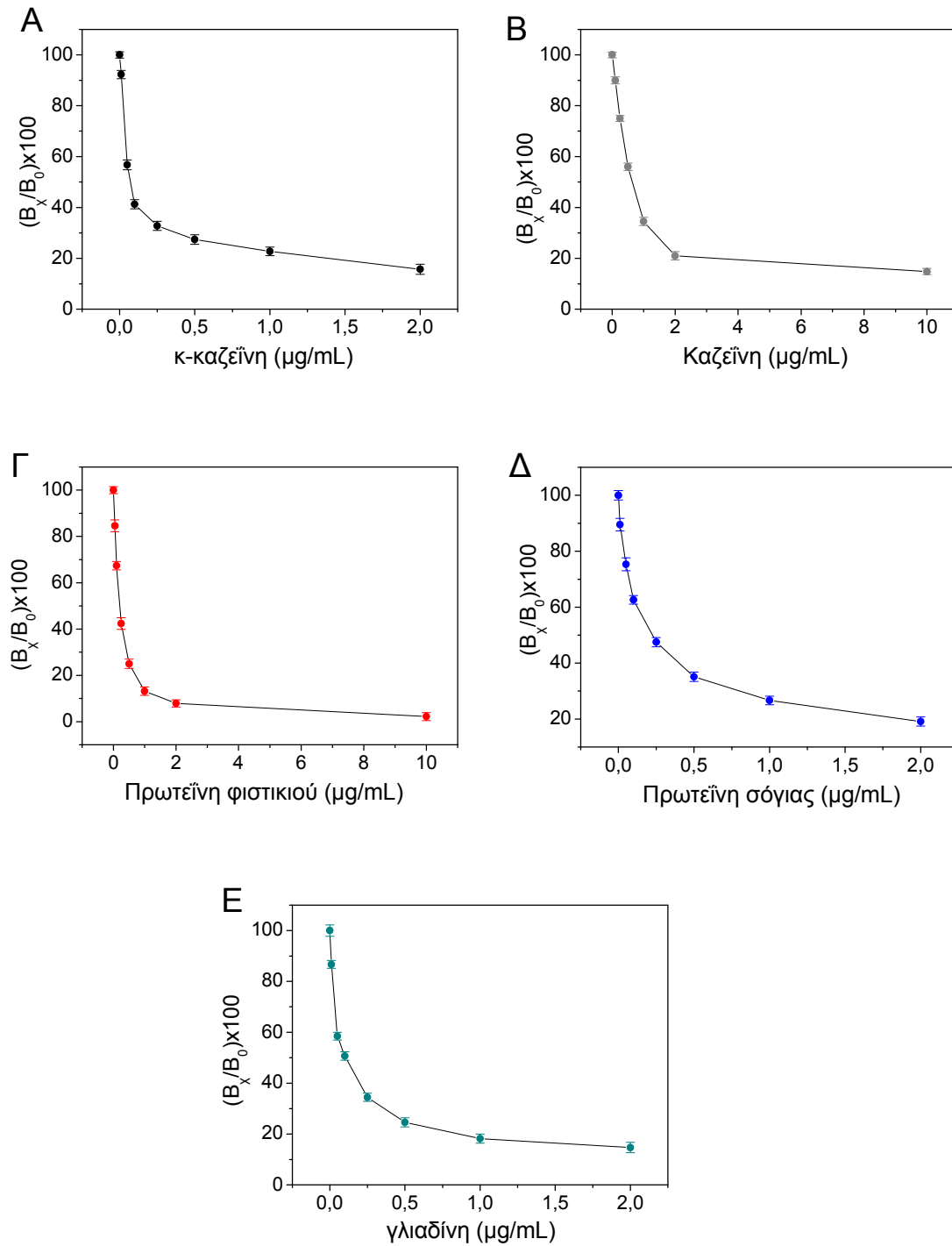
τη γλιαδίνη. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ως μέσο για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων το ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης.



Σχήμα 18: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο καθώς και για πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης σόγιας συγκέντρωσης 50, 250 και 500 ng/mL τα οποία έχουν παρασκευαστεί: σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης (■), σε νερό δικτύου (●), σε μίγμα νερού δικτύου/διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε αναλογία 50:50 (▲) και σε μίγμα νερού δικτύου/ διαλύματος ανοσοαντίδρασης σε αναλογία 20:80 (▼). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

7.1.7 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης

Μετά την βελτιστοποίηση των διαφόρων παραμέτρων των ανοσοχημικών προσδιορισμών των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών που παρουσιάστηκε στα προηγούμενα εδάφια, καταρτίστηκαν τα τελικά πρωτόκολλα των προσδιορισμών τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στο εδάφιο 6.4.1. Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν με το τελικό πρωτόκολλο ανοσοχημικού προσδιορισμού για τη κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού, την πρωτεΐνη σόγιας και τη γλιαδίνη παρουσιάζονται στο σχήμα 19 Α, Γ, Δ και Ε, αντίστοιχα. Επιπλέον, με το ίδιο πρωτόκολλο κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης της ολικής καζεΐνης, η οποία παρουσιάζεται στο σχήμα 19 Β.



Σχήμα 19: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης της: **A)** κ-καζεΐνης, **B)** ολικής καζεΐνης, **Γ)** πρωτεΐνης φιστικιού, **Δ)** πρωτεΐνη σόγιας και **Ε)** γλιαδίνης που ελήφθησαν με το τελικό πρωτόκολλο ανοσοενζυμικού προσδιορισμού σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των ανοσοενζυμικών προσδιορισμών των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών. Το όριο ανίχνευσης (LOD) για την κάθε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με 100-3SD 24 επαναληπτικών μετρήσεων του αντίστοιχου μηδενικού προτύπου. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με 100-6SD 24 επαναληπτικών μετρήσεων του αντίστοιχου μηδενικού προτύπου. Επίσης προσδιορίστηκε για κάθε πρωτεΐνη, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με 50% ως προς το σήμα του μηδενικού προτύπου, IC₅₀. Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού, η οποία εκφράζεται ως ο συντελεστής διακύμανσης της μέσης τιμής των μετρήσεων (CV%), παρασκευάστηκαν τρία δείγματα ελέγχου με προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων της καθεμίας από τις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες σε νερό δικτύου. Η ένδο-αναλυτική επαναληψιμότητα προέκυψε από τρεις επαναληπτικές μετρήσεις των δειγμάτων ελέγχου εντός του ίδιου προσδιορισμού, ενώ η διαναλυτική επαναληψιμότητα προέκυψε από μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν σε είκοσι διαφορετικές μέρες σε διάστημα δύο μηνών.

Πίνακας 4: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των ανοσοενζυμικών προσδιορισμών των πέντε αλλεργιογόνων πρωτεϊνών.

	κ-καζεΐνη	καζεΐνη	Πρωτεΐνη φιστικιού	Πρωτεΐνη σόγιας	Γλιαδίνη
LOD (ng/mL)	4,2	33	15	7,4	4,6
LOQ (ng/mL)	10	55	31	15	10
IC50 (ng/mL)	70	627	200	220	970
Δυναμικό εύρος (ng/mL)	10-2000	200-10000	50-10000	50-10000	10-2000
Ένδο-αναλυτικό CV (%)	1,1-2,2	1,05-2,4	1,8-3,0	1,7-2,8	1,1-2,8
Διαναλυτικό CV (%)	1,6-2,9	1,45-3,0	2,2-4,5	1,9-3,2	1,8-3,2

7.2 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ανοσοχημικού προσδιορισμού βοείου κ-καζεΐνης, πρωτεΐνης φιστικιού, πρωτεΐνης σόγιας και γλιαδίνης με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα

Για τη μεταφορά των μεθόδων που αναπτύχθηκαν στα φρεάτια μικροπιλοδότησης για τα τέσσερα αλλεργιογόνα στον οπτικό ανοσοαισθητήρα, απαιτήθηκε εκ νέου βελτιστοποίηση κάποιων από τις συνθήκες, καθώς στον οπτικό ανοσοαισθητήρα δεν χρησιμοποιούνται ιχνηθετημένα μόρια για την ανίχνευση.

Αρχικά, ελέγχθηκε η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί το διάλυμα ανοσοαντίδρασης και το διάλυμα έκπλυσης που είχε επιλεγεί κατά την βελτιστοποίηση του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού στα σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Αυτό κρίθηκε απαραίτητο κυρίως λόγω της παρουσίας του επιφανειοδραστικού Tween 20 στα δύο αυτά διαλύματα, το οποίο αλληλοεπιδρά με τις ακινητοποιημένες στην επιφάνεια του αισθητήρα πρωτεΐνες και μπορεί να επηρεάσει τόσο το αναλυτικό σήμα όσο και την επαναφορά του σήματος γραμμής βάσης εφόσον απαιτηθεί να χρησιμοποιηθούν και διαλύματα που δεν περιέχουν Tween 20 σε ενδιάμεσα στάδια (π.χ. διάλυμα αναγέννησης).

Από προκαταρκτικά πειράματα βρέθηκε ότι η παρουσία του Tween 20 στα διαλύματα ανοσοαντίδρασης και έκπλυσης δεν επηρέαζε το λαμβανόμενο σήμα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία Tween 20 στο διάλυμα έκπλυσης είχε ως αποτέλεσμα σημαντική επιμήκυνση του χρόνου που απαιτείτο για την εξισορρόπηση του σήματος βάσης μετά την αναγέννηση των επιφανειών (>15 min), συγκριτικά με την περίπτωση που το διάλυμα έκπλυσης δεν περιείχε Tween 20. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα ανοσοαντίδρασης και έκπλυσης που δεν περιείχαν Tween 20 για την ανάπτυξη των ανοσοχημικών προσδιορισμών των τεσσάρων πρωτεϊνών στο οπτικό αισθητήρα.

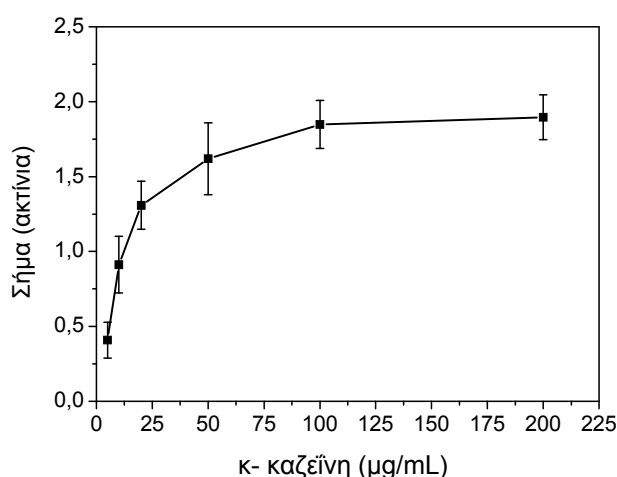
Επιπλέον, μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι:

- Συγκέντρωση αλλεργιογόνου πρωτεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης
- Επιλογή αντισωμάτων και προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσής τους για την ανοσοαντίδραση
- Η χρονική διάρκεια των σταδίων του ανοσοπροσδιορισμού. Επιλογή κατάλληλης μικρορευστομηχανικής κυψελίδας/βέλτιστης ταχύτητας ροής
Δυνατότητα αναγέννησης της βιοενεργοποιημένης με αλλεργιογόνο πρωτεΐνη επιφάνειας
- Δυνατότητα ταυτόχρονου προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων

7.2.1 Επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης αλλεργιογόνου πρωτεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης

Η πρώτη παράμετρος που ελέγχθηκε προκειμένου να επιτευχθεί επάρκεια αναλυτικού σήματος καθώς και ομοιογένεια ακινητοποίησης των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στην επιφάνεια του αισθητήρα ήταν η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο διάλυμα ακινητοποίησης. Για τον σκοπό αυτό, εναποτέθηκαν με αυτόματη ρομποτική συσκευή εναπόθεσης μικροκηλίδων σε τροποποιημένες με APTES ψηφίδες πυριτίου διαλύματα καθεμιάς από τις πρωτεΐνες σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 5 έως 200 $\mu\text{g/mL}$. Μετά την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών, και κατεργασία των επιφανειών επί 60 min με το διάλυμα αποκλεισμού των ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας στις ψηφίδες, διαβιβάστηκαν από τις ψηφίδες διαλύματα των ειδικών έναντι των ακινητοποιημένων αλλεργιογόνων αντισωμάτων σε συγκεντρώσεις 2, 8 και 9 $\mu\text{g/mL}$ για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας, αντίστοιχα, και σε αραιώση 1/10 για τη γλιαδίνη. Οι συγκεντρώσεις αυτές βρέθηκε από προκαταρκτικά πειράματα ότι παρείχαν μέγιστα σήματα οροφής για χρόνο αντίδρασης 30 min με τις ακινητοποιημένες στην ψηφίδα πρωτεΐνες .

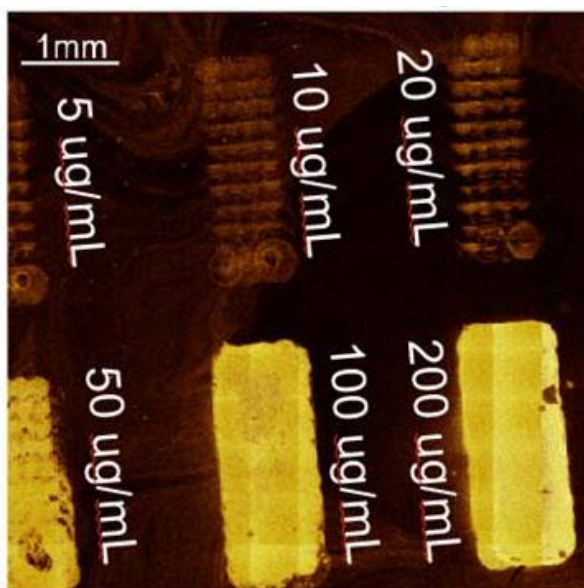
Στο σχήμα 20 παρουσιάζονται, ενδεικτικά για την κ-καζεΐνη, οι μέσες τιμές αναλυτικού σήματος που ελήφθησαν με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης καθώς και η διακύμανση του αναλυτικού σήματος μεταξύ των δέκα MZIs της ίδιας ψηφίδας.



Σχήμα 20: Τιμές αναλυτικού σήματος (ακτίνια) που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο κ-καζεΐνης με το αντίσωμα 33-4G10 από ψηφίδες που είχαν επικαλυφθεί με διάλυμα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 5, 10, 20, 50, 100 και 200 $\mu\text{g/mL}$. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων $\pm\text{SD}$.

Όπως φαίνεται στο σχήμα, μέγιστο σήμα οροφής ελήφθη για συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης μεγαλύτερες ή ίσες από 100 $\mu\text{g/mL}$. Ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα ήταν ότι η διακύμανση του αναλυτικού σήματος μειωνόταν συνεχώς καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης από 5 σε 100 mg/mL , όπου και επιτυγχανόταν διακύμανση μικρότερη από 10%.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω ο λόγος για τον οποίο στις χαμηλές συγκεντρώσεις κ-καζεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης, υπάρχει υψηλή διακύμανση του αναλυτικού σήματος μεταξύ των MZIs της ίδιας ψηφίδας πραγματοποιήθηκαν πειράματα απεικόνισης και χημικής ανάλυσης επιφανειών που προσομοιάζαν με την επιφάνεια των κυματοδηγών με φασματομετρία μάζας δευτερογενών ιόντων με αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF-SIMS). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ψηφίδες πυριτίου στις οποίες αναπτύχθηκε υμένιο θερμικού οξειδίου του πυριτίου (SiO_2) πάχους 2 nm πάνω από το οποίο εναποτέθηκε με LPCVD υμένιο νιτριδίου του πυριτίου (Si_3N_4) πάχους 150 nm. Στις επιφάνειες αυτές εναποτέθηκαν διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεων από 5 έως 200 $\mu\text{g/mL}$ με τρόπο όμοιο με αυτό που εφαρμόζεται στις ψηφίδες πυριτίου (Εικόνα 25).

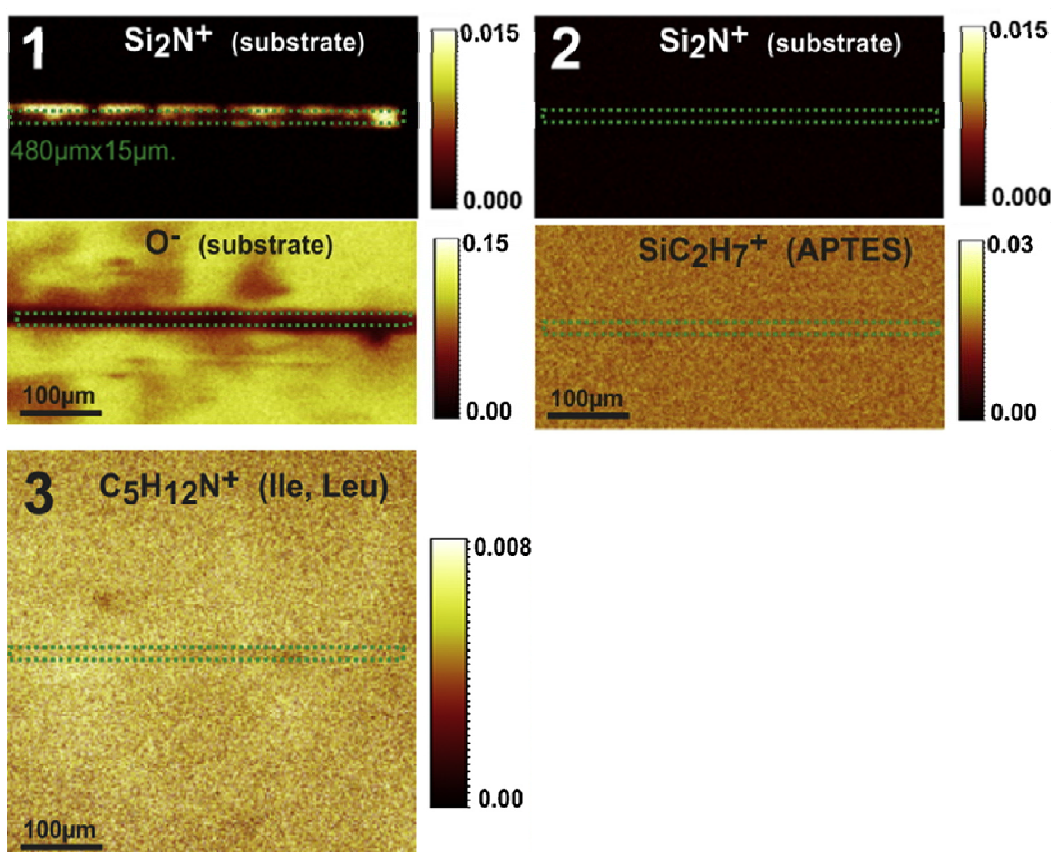


Εικόνα 25: TOF-SIMS ανάλυση ψηφίδων οξειδίου του πυριτίου επιστρωμένων με Si_3N_4 στα οποία έχει ακινητοποιηθεί διάλυμα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 5, 10, 20, 50, 100 και 200 $\mu\text{g/mL}$.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 25, η εναπόθεση του διαλύματος κ-καζεΐνης με μικροκηλίδες έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μη ομοιόμορφης πρωτεϊνικής

στιβάδας για συγκεντρώσεις ≤ 50 $\mu\text{g/mL}$, ενώ για συγκεντρώσεις ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$ παρατηρήθηκε ομοιογενής κατανομή της πρωτεΐνης στην επιφάνεια των ψηφίδων.

Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα αυτό, σε ψηφίδες πυριτίου της παρούσας διατριβής εναποτέθηκε διάλυμα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 100 $\mu\text{g/mL}$ με την ρομποτική συσκευή εναπόθεσης μικροκηλίδων και ακολούθησε ανάλυση με TOF-SIMS (Εικόνα 26). Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 26, για συγκέντρωση κ-καζεΐνης 100 $\mu\text{g/mL}$ παρατηρείται ομοιογενής κατανομή της πρωτεΐνης τόσο πάνω στον αισθητήριο βραχίονα του MZI όσο και στην παρακείμενη περιοχή της ψηφίδας πυριτίου. Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε και για την πρωτεΐνη φιστικιού, την πρωτεΐνη σόγιας και τη γλιαδίνη, κατά την οποία ελήφθησαν παρόμοια αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, επιλέχθηκε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$ των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στο διάλυμα ακινητοποίησης για τα επόμενα πειράματα.



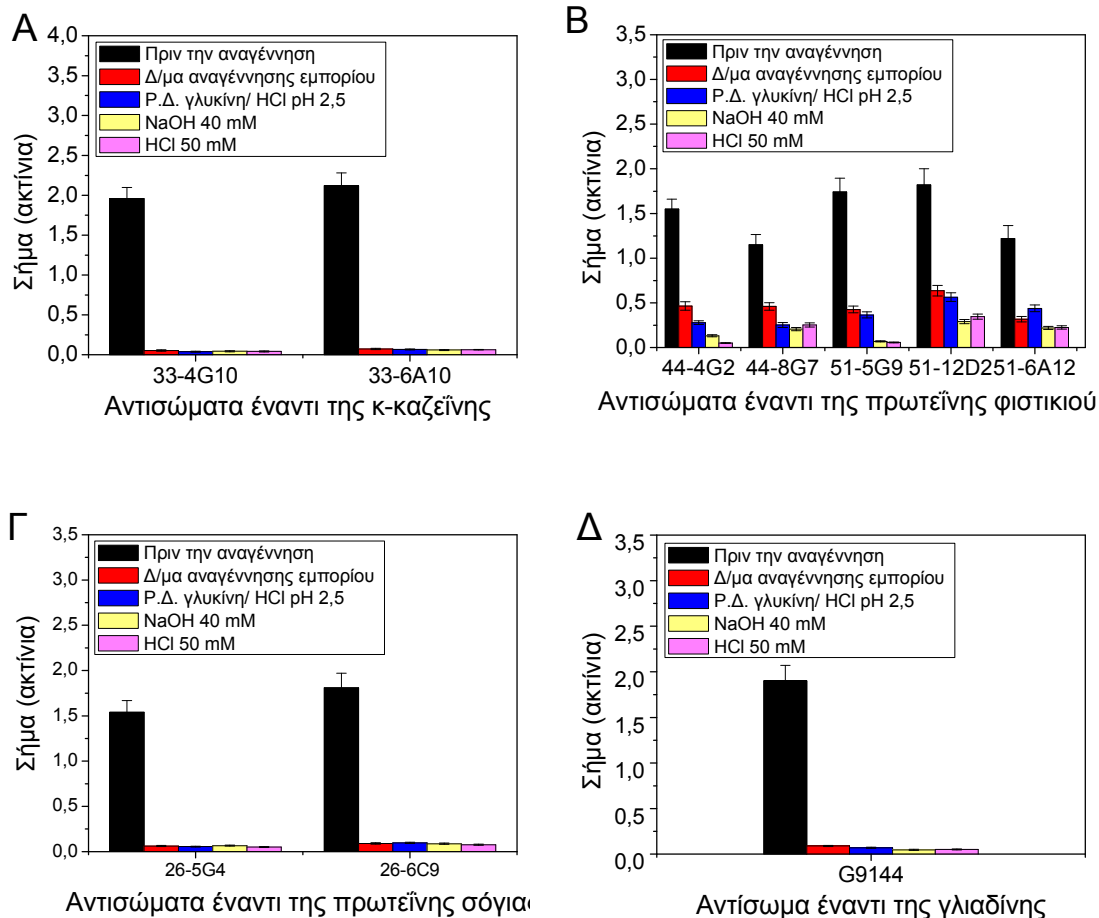
Εικόνα 26: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανάλυσης με TOF-SIMS της περιοχής γύρω από τον αισθητήριο βραχίονα ενός MZI: 1) προ χημικής τροποποίησης, 2) κατόπιν χημικής τροποποίησης με APTES, και 3) κατόπιν ακινητοποίησης κ-καζεΐνης από διάλυμα συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/mL}$.

7.2.2 Μελέτη δυνατότητας απομάκρυνσης των ειδικών αντισωμάτων από τις ακινητοποιημένες στην ψηφίδα πυριτίου αλλεργιογόνες πρωτεΐνες

Στο πλαίσιο της ανάπτυξης του ανοσοαισθητήρα για τον προσδιορισμό των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών μελετήθηκε η δυνατότητα αναγέννησης των ακινητοποιημένων στον αισθητήριο βραχίονα της ψηφίδας βιομορίων, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την πραγματοποίηση διαδοχικών μετρήσεων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για καθένα από τα ειδικά αντισώματα προκειμένου να βρεθούν αυτά που απομακρύνονται πιο εύκολα από την ακινητοποιημένη στην ψηφίδα πυριτίου αλλεργιογόνο πρωτεΐνη. Για το σκοπό αυτό, μετά από διαβίβαση μηδενικού πρότυπου διαλύματος της κάθε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης για 30 min ελέγχθηκαν διάφορα διαλύματα αναγέννησης έτσι ώστε να επιλεγεί αυτό που αφήνει όσο το δυνατόν μικρότερο υπόλειμμα δεσμευμένων αντισωμάτων και δεν επηρεάζει αρνητικά την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη. Το υπόλειμμα υπολογίστηκε ως η διαφορά στο σήμα της γραμμής βάσης πριν τη διέλευση του μηδενικού προτύπου διαλύματος και μετά την αναγέννηση της ψηφίδας.

Με τον τρόπο αυτό δοκιμάστηκαν για την κ-καζεΐνη τα μονοκλωνικά αντισώματα 33-4G10 και 33-6A10 σε συγκέντρωση 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ το καθένα, για την πρωτεΐνη φιστικιού τα μονοκλωνικά αντισώματα 44-4G2, 44-8G7, 51-5G9, 51-12D2 και 51-6A12 σε συγκέντρωση 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ το καθένα, για την πρωτεΐνη σόγιας τα μονοκλωνικά αντισώματα 26-5G4 και 26-6C9 σε συγκέντρωση 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ το καθένα και για τη γλιαδίνη το πολυκλωνικό αντίσωμα G-9144 σε αραιώση 1/10. Τα διαλύματα αναγέννησης που αξιολογήθηκαν ήταν: εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα έκλουσης IgG από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας, ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M γλυκίνης/HCl, pH 2,5, διάλυμα NaOH 40 mM και διάλυμα HCl 50 mM. Για την παρασκευή των ψηφίδων χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα καθεμιάς από τις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Στο σχήμα 21 παρουσιάζονται οι τιμές σήματος που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα της κάθε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης πριν την αναγέννηση καθώς και τιμές αναλυτικού σήματος που αντιστοιχούν στο υπολειπόμενο σήμα μετά την αναγέννηση της επιφάνειας με τα τέσσερα διαφορετικά διαλύματα.



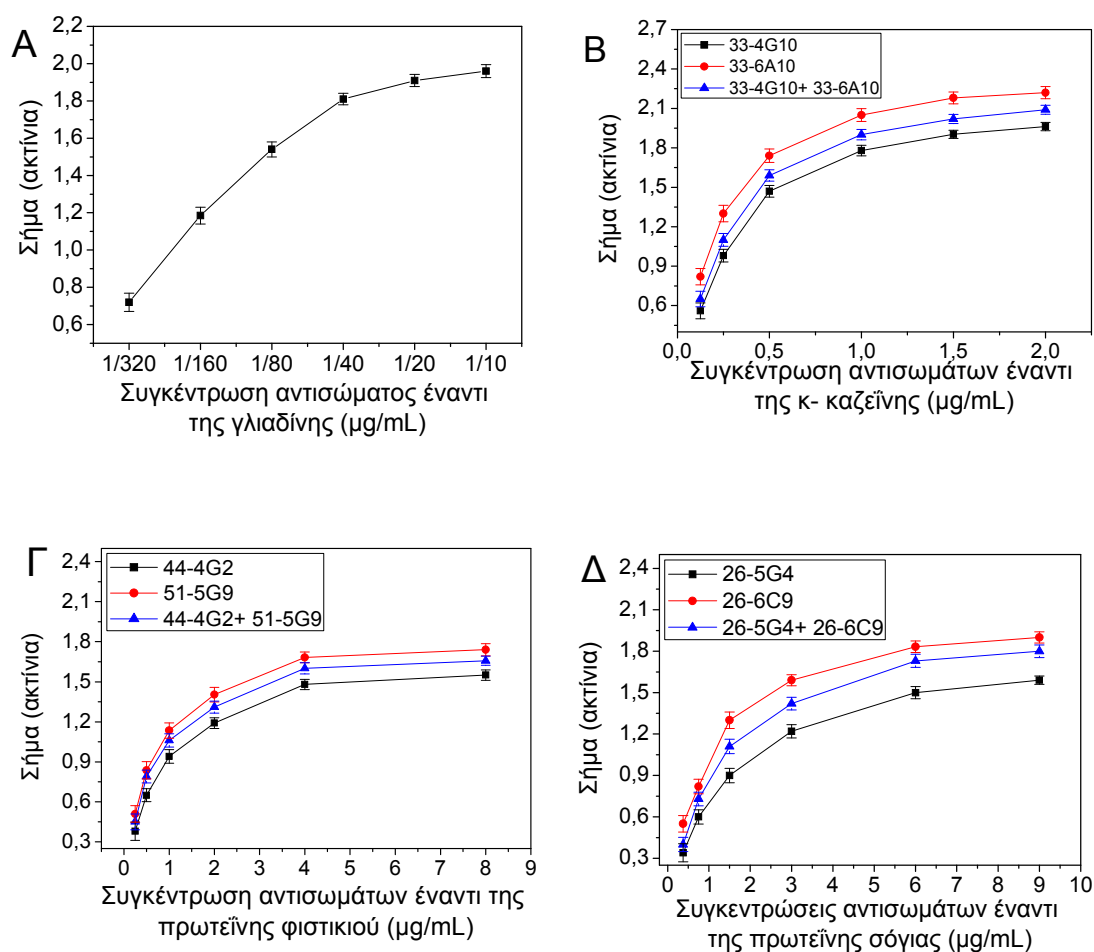
Σχήμα 21: Τιμές αναλυτικού σήματος (ακτίνια) που ελήφθησαν για την: **Α)** κ-καζεΐνη με τα δύο διαφορετικά αντισώματα (33-4G10 και 33-6A10), **Β)** πρωτεΐνη φιστικιού με τα πέντε διαφορετικά αντισώματα (44-4G2, 44-8G7, 51-5G9, 51-12D2, και 51-6A12), **Γ)** πρωτεΐνη σόγιας με τα δύο διαφορετικά αντισώματα (25-5G4, 26-6C9) και **Δ)** γλιαδίνη με το αντίσωμα G-9144 για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα (μαύρες στήλες) και για το υπόλειμμα μετά την αναγέννηση με: εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα έκλουσης IgG (κόκκινες στήλες), ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M γλυκίνης/HCl, pH 2,5 (μπλε στήλες), διάλυμα NaOH 40 mM (κίτρινες στήλες), ή διάλυμα HCl 50 mM (ροζ στήλες). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως προκύπτει από το σχήμα 21 Α, Γ και Δ που αφορά στην κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη σόγιας και τη γλιαδίνη, αντίστοιχα, επιτυγχάνεται σχεδόν πλήρης αναγέννηση της επιφάνειας και με τα τέσσερα διαφορετικά διαλύματα, καθώς το σήμα που αντιστοιχεί στο υπόλειμμα είναι μικρότερο από 5% της τιμής του μηδενικού προτύπου. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης φιστικιού δεν επιτυγχάνεται ικανοποιητική αναγέννηση της επιφάνειας με κανένα από τα τέσσερα διαλύματα που δοκιμάστηκαν όταν χρησιμοποιούνται τα αντισώματα 44-8G7, 51-12D2 και

51-6A12. Και στις τρεις περιπτώσεις, το σήμα που αντιστοιχούσε στο υπόλειμμα κυμαινόταν από 20-40% της τιμής του μηδενικού προτύπου. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα 44-4G2 και 51-5G9 επετεύχθη ικανοποιητική αναγέννηση της επιφάνειας (υπόλειμμα <4%) με χρήση του διαλύματος HCl 50 mM ως διάλυμα αναγέννησης. Ως εκ τούτου, υιοθετήθηκαν τα αντισώματα 44-4G2 και 51-5G9 στο πρωτόκολλο του ανοσοχημικού προσδιορισμού πρωτεΐνης φιστικιού στον οπτικό αισθητήρα. Επιπλέον, ως διάλυμα αναγέννησης επιλέχθηκε το HCl 50 mM, το οποίο παρείχε σχεδόν πλήρη αναγέννηση για όλες τις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες.

7.2.3 Επιλογή των ειδικών αντισωμάτων έναντι των τεσσάρων αλλεργιογόνων καθώς και βελτιστοποίηση της συγκέντρωσή τους

Στα πλαίσια της ανάπτυξης των ανοσοχημικών προσδιορισμών για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ελέγχθηκαν εκ νέου τα ειδικά αντισώματα και βελτιστοποιήθηκε η συγκέντρωσή τους. Συγκεκριμένα, για τη γλιαδίνη δοκιμάστηκε το αντίσωμα G-9144 σε αραιώσεις από 1/10 έως 1/320, για την κ-καζεΐνη τα αντισώματα 33-4G10 και 33-6A10 σε εύρος συγκεντρώσεων 0,125 έως 2 µg/mL, για την πρωτεΐνη φιστικιού τα αντισώματα 44-4G2 και 52-5G9 σε εύρος συγκεντρώσεων 0,25 έως 8 µg/mL και για την πρωτεΐνη σόγιας τα αντισώματα 26-5G4 και 26-6C9 σε εύρος συγκεντρώσεων 0,375 έως 9 µg/mL (Σχήμα 22 Α, Β, Γ και Δ). Ωστόσο, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της ανίχνευσης μέσω μείωσης της συγκέντρωσης των αντισωμάτων, χωρίς να συνοδεύεται από μείωση του αναλυτικού σήματος, δοκιμάστηκαν μίγματα δύο μονοκλωνικών αντισωμάτων για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας, τα οποία αναγνωρίζουν τις συγκεκριμένες αλλεργιογόνες πρωτεΐνες σε διαφορετικούς επιτόπους και επομένως αυξάνουν το πάχος της βιομοριακής στιβάδας. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε μίγμα δύο μονοκλωνικών αντισωμάτων η κατά βάρος αναλογία τους ήταν 1:1 και η συνολική συγκέντρωση ίση με την αντίστοιχη των μεμονωμένων αντισωμάτων.



Σχήμα 22: Τιμές αναλυτικού σήματος (ακτίνια) που λαμβάνονται για μηδενικό πρότυπο διάλυμα A) γλιαδίνης συναρτήσεως της αραίωσης του αντισώματος G-9144, B) κ-καζεΐνης συναρτήσεως της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 33-4G10 (■), 33-6A10 (●), ή μίγματος αυτών σε αναλογία 1:1 (▲), Γ) πρωτεΐνης φιστικιού συναρτήσεως της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 44-4G2 (■), 51-5G9 (●), ή μίγματος αυτών σε αναλογία 1:1 (▲) και Δ) πρωτεΐνης σόγιας συναρτήσεως της συγκέντρωσης των αντισωμάτων 26-5G4 (■), 26-6C9 (●), ή μίγματος αυτών σε αναλογία 1:1 (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

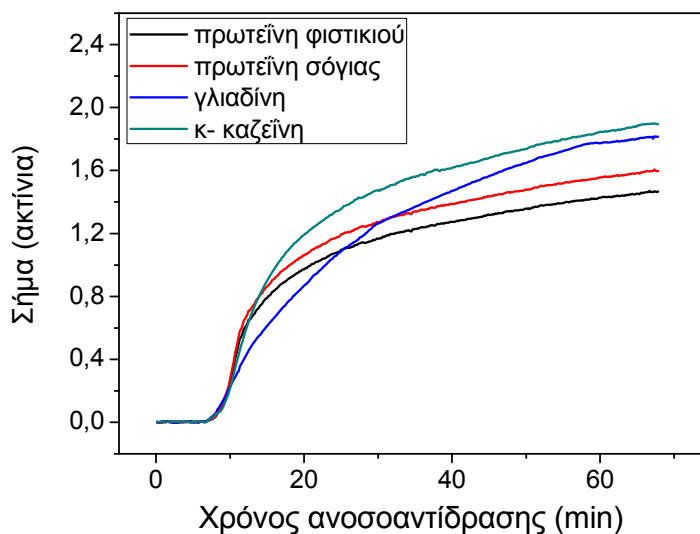
Όπως προκύπτει από το σχήμα 22 A, για την γλιαδίνη, επαρκές αναλυτικό σήμα λαμβάνονταν για αραίωση ίση με ή μικρότερη από 1/80, η οποία και επιλέχθηκε για την ανάπτυξη του ανοσοχημικού προσδιορισμού στον αισθητήρα. Σύμφωνα με τα σχήματα 22 B, Γ και Δ, επάρκεια αναλυτικού σήματος ελήφθη όταν η συγκέντρωση των μεμονωμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας ήταν 0,5, 2, και 3 μg/mL, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά όταν χρησιμοποιήθηκαν μίγματα των μονοκλωνικών αντισωμάτων, επαρκή σήματα, παρεμφερή με εκείνα που

ελήφθησαν με τα μεμονωμένα αντισώματα, επιτεύχθηκαν όταν οι συγκεντρώσεις των μονοκλωνικών αντισωμάτων στα μίγματα ήταν υποδιπλάσιες σε σχέση με τα μεμονωμένα. Επιπλέον, η χρήση μειωμένης συγκέντρωσης των αντισωμάτων στα μίγματα είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ευαισθησίας ανίχνευσης όλων των επί μέρους μεθόδων κατά τουλάχιστον δύο φορές. Βάσει αυτών των ευρημάτων, τα μίγματα των αντισωμάτων: 33-4G10/33-6A10 σε τελικές συγκεντρώσεις 0,25 μg/mL το καθένα, 44-4G2/51-12D2 σε συγκεντρώσεις 1 μg/mL το καθένα και 26-5G4/26-6C9 σε συγκεντρώσεις 1,5 μg/mL το καθένα, υιοθετήθηκαν στο τελικό πρωτόκολλο του ανοσοχημικού προσδιορισμού των τριών αλλεργιογόνων.

7.2.4 Μελέτη της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης

Η επόμενη παράμετρος που μελετήθηκε στα πλαίσια της ανάπτυξης του ανοσοχημικού προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ήταν η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης. Για τον σκοπό αυτό, ψηφίδες πυριτίου επικαλύφθηκαν μέσω επώασης με διάλυμα κ-καζεΐνης, πρωτεΐνης φιστικιού, πρωτεΐνης σόγιας ή γλιαδίνης συγκεντρώσεως 100 μg/mL. Μετά τον αποκλεισμό ελευθέρων θέσεων δέσμευσης της επιφάνειας της ψηφίδας, πραγματοποιήθηκε διαβίβαση μίγματος μηδενικού προτύπου διαλύματος με διάλυμα των ειδικών έναντι της κάθε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης αντισωμάτων στις συγκεντρώσεις που είχαν επιλεγεί (εδάφιο 7.2.3) σε κατ' όγκο αναλογία 1:1 και για χρονικό διάστημα 60 min (Σχήμα 23).

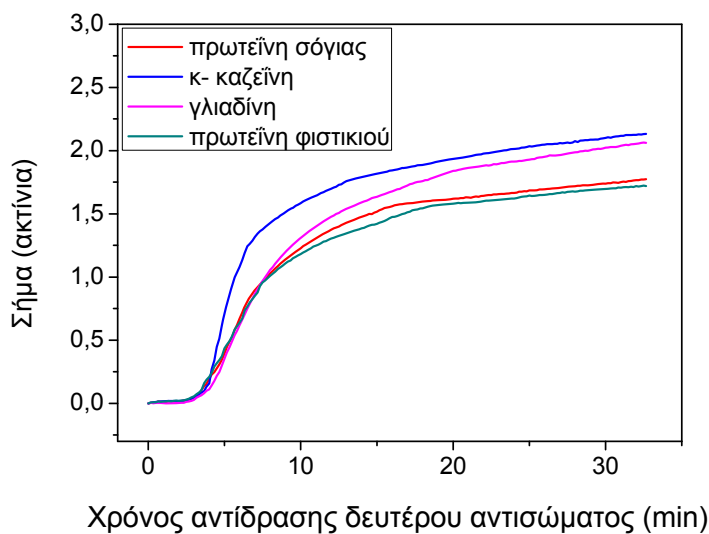
Όπως προκύπτει από το Σχήμα 23, το αναλυτικό σήμα αυξάνεται συνεχώς με την αύξηση του χρόνου ανοσοαντίδρασης και προσεγγίζει τιμές οροφής για χρόνους ≥ 50 min. Πιο συγκεκριμένα, για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας ελήφθη επαρκές αναλυτικό σήμα (≥ 1 ακτινίου) στα πρώτα 10 min της ανοσοαντίδρασης, το οποίο ήταν $>50\%$ του μέγιστου αναλυτικού σήματος. Στην περίπτωση της γλιαδίνης, απαιτείτο χρόνος 15 min προκειμένου να επιτευχθεί σήμα $>50\%$ ποσοστό μέγιστου αναλυτικού σήματος. Ωστόσο, στοχεύοντας στον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τεσσάρων αλλεργιογόνων επιλέχθηκε ο χρόνος 10 min, κατά τον οποίο λαμβάνεται ικανοποιητικό σήμα για όλες τις προς μέτρηση ουσίες.



Σχήμα 23: Μεταβολή του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα συναρτήσει της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης για την: πρωτεΐνη φιστικιού (■), πρωτεΐνη σόγιας (●), γλιαδίνη (▲) και κ-καζεΐνη (▼).

7.2.5 Μελέτη της χρονικής διάρκειας της αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με τα ειδικά αντισώματα έναντι των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών

Με στόχο να μειωθεί περαιτέρω ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης και ταυτόχρονα η κατανάλωση των ειδικών αντισωμάτων, δοκιμάστηκε η εισαγωγή ενός επιπλέον σταδίου μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης με χρήση αντισωμάτων έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού/κουνελιού ανάλογα με το αν το ειδικό αντίσωμα έχει αναπτυχθεί σε ποντίκι ή κουνέλι (δευτερο αντίσωμα) ως μέσο ενίσχυσης του σήματος. Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκε χρονική μελέτη της αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με τα ειδικά αντισώματα τα οποία είχαν ανοσοπροσοφρηθεί στα ακινητοποιημένα στις ψηφίδες μόρια της κάθε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης. Ως εκ τούτου, διαβιβάστηκε πάνω από τις τροποποιημένες με την κάθε αλλεργιογόνο πρωτεΐνη ψηφίδες πυριτίου, μίγμα μηδενικού προτύπου με τα ειδικά κατά της αντίστοιχης πρωτεΐνης αντισώματα σε αναλογία 1:1 για 5 min και ακολούθησε διέλευση του διαλύματος του αντίστοιχου δευτέρου αντισώματος για 30 min (Σχήμα 24).



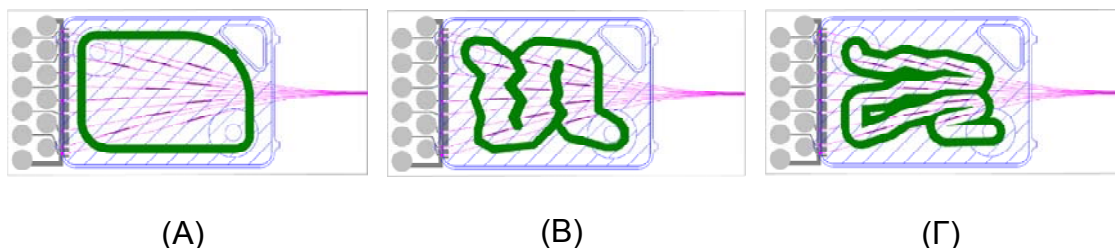
Σχήμα 24: Μεταβολή του σήματος που ελήφθη για μηδενικό πρότυπο διάλυμα συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του δευτέρου αντισώματος με τα ειδικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης σόγιας (●), κ-καζεΐνης (▲) γλιαδίνης (■) και πρωτεΐνης φιστικιού (▼). Η διάρκεια του πρώτου σταδίου της ανοσοανάλυσης ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 5 min.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 24, η εισαγωγή του δευτέρου αντισώματος είχε ως αποτέλεσμα ραγδαία μεταβολή του αναλυτικού σήματος. Πιο συγκεκριμένα, μετά από 5 min αντίδρασης του εκάστοτε δευτέρου αντισώματος με τα αντίστοιχα ειδικά αντισώματα, επιτεύχθηκε περίπου το 60% του μεγίστου αναλυτικού σήματος. Επομένως, με διαβίβαση μίγματος μηδενικού προτύπου διαλύματος για 5 min ακολουθούμενη από διάλυμα δευτέρου αντισώματος για άλλα 5 min, είναι δυνατό να ληφθεί επαρκές αναλυτικό σήμα (> 1 ακτίνιο) και για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι κατά την ανάλυση σε δύο στάδια, η κατανάλωση του ειδικού αντισώματος στα 5 min ανοσοαντίδρασης ήταν δύο φορές μικρότερη σε σχέση με την ανάλυση σε ένα στάδιο.

7.2.6 Επιλογή της διαμόρφωσης της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας

Για τα πειράματα που έχουν περιγραφεί έως τώρα χρησιμοποιήθηκε η μικρορευστομηχανική κυψελίδα που απεικονίζεται στην εικόνα 27 A, η οποία θα αναφέρεται τούδε και στο εξής ως κυψελίδα τύπου A. Η χρήση της κυψελίδας αυτής είναι πιθανό να οδηγεί σε αποκλίσεις στις αποκρίσεις των MZIs της ίδιας ψηφίδας λόγω της μη ομοιόμορφης ροής των υγρών σε όλα τα σημεία. Για τον

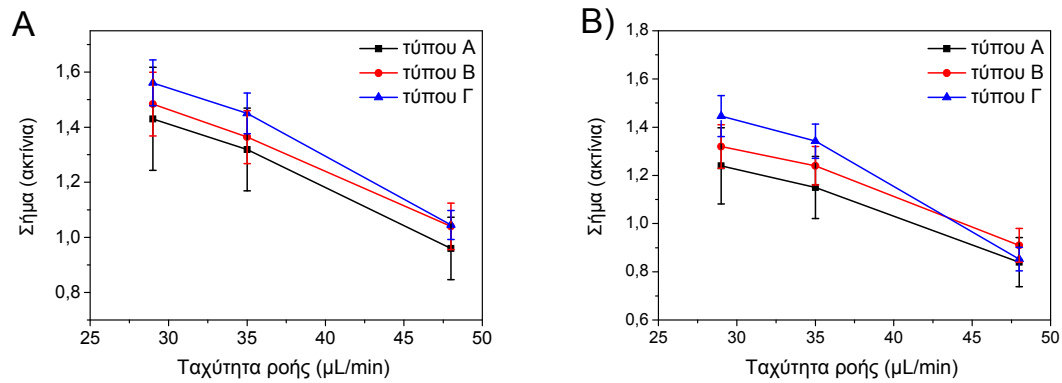
λόγο αυτό, σχεδιάστηκαν και δοκιμάστηκαν άλλες δύο διαμορφώσεις μικρορρευστομηχανικής κυψελίδας, τύπου Β και τύπου Γ, οι οποίες απεικονίζονται επίσης στην εικόνα 25.



Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση μικρορρευστομηχανικών κυψελίδων με διαμόρφωση τύπου (Α), (Β) και (Γ), αντίστοιχα, και η σχετική τους θέση ως προς την ψηφίδα.

Οι διαμορφώσεις αυτές σε αντίθεση με την τύπου Α αναμένεται να οδηγήσουν σε πιο ομοιόμορφη κατανομή και καλύτερη διάχυση των ανοσοαντιδραστηρίων και επομένως αντίδραση αυτών με τα ακινητοποιημένα στην ψηφίδα βιομόρια.

Ως εκ τούτου, η επιλογή της μικρορρευστομηχανικής κυψελίδας πραγματοποιήθηκε με κριτήριο την επάρκεια αναλυτικού σήματος και την επαναληψιμότητα του σήματος μεταξύ των διαφορετικών ΜΖΙς της ίδιας ψηφίδας τα οποία είχαν βιοενεργοποιηθεί με την ίδια αλλεργιογόνο πρωτεΐνη. Για τα πειράματα αυτά, χρησιμοποιήθηκε εισαγωγέας δείγματος συνδεδεμένος με βρόχο όγκου 100 μL ώστε σε κάθε στάδιο να διαβιβάζεται σταθερός όγκος διαλύματος. Για καθεμία από τις τρεις μικρορρευστομηχανικές κυψελίδες εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές ροές (30 $\mu\text{L}/\text{min}$, 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ και 50 $\mu\text{L}/\text{min}$), έτσι ώστε ο χρόνος διαβίβασης των ειδικών αντισωμάτων καθώς και του δευτέρου αντισώματος να είναι 240 sec (120 sec και 120 sec), 400 sec (200 sec και 200 sec) και 500 sec (250 sec και 250 sec), αντίστοιχα. Στο σχήμα 25 παρουσιάζεται ενδεικτικά για την κ-καζεΐνη και την πρωτεΐνη σόγιας, το αναλυτικό σήμα που ελήφθη με τις τρεις μικρορρευστομηχανικές κυψελίδες για τις τρεις διαφορετικές ροές που εφαρμόστηκαν.



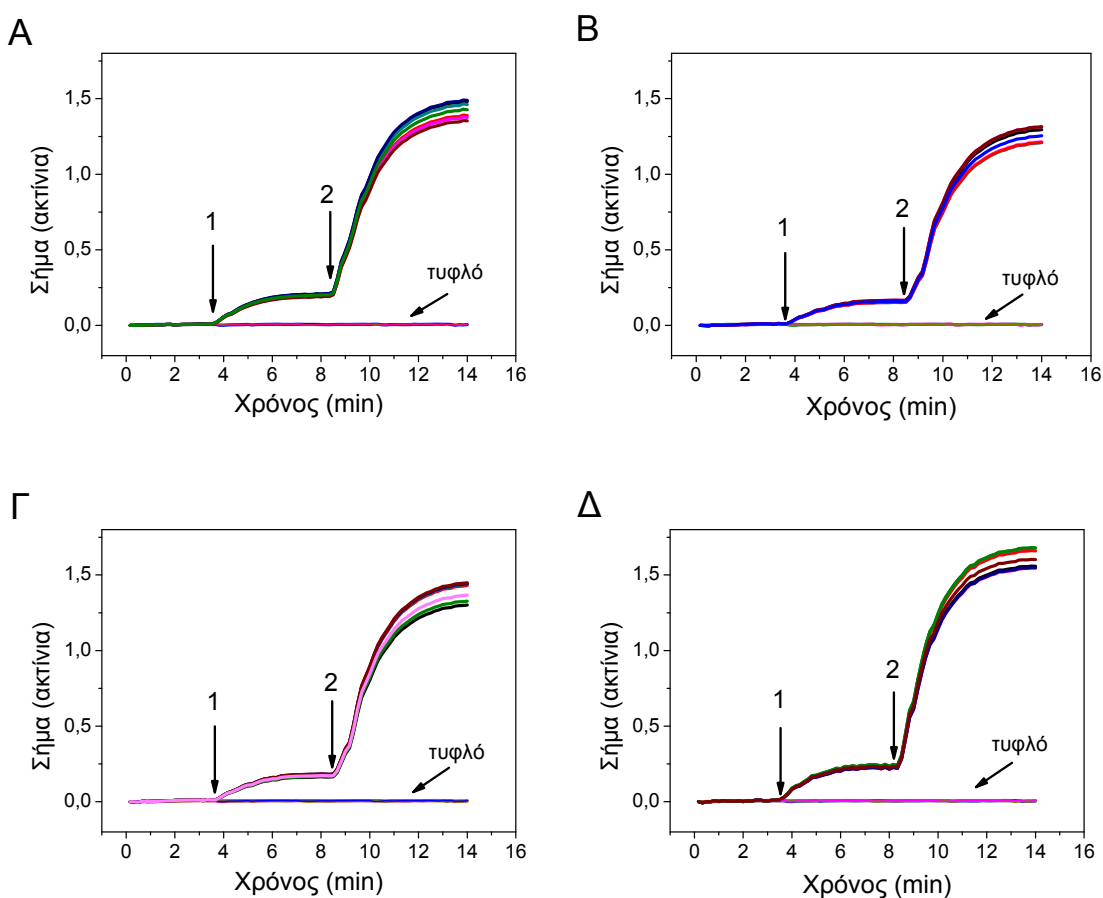
Σχήμα 25: Αναλυτικό σήμα (ακτίνια) που ελήφθη ενδεικτικά για Α) την κ-καζεΐνη και Β) την πρωτεΐνη σόγιας, με τη μικρορευστομηχανική κυψελίδα τύπου Α (■), τύπου Β (●) και τύπου Γ (▲) συναρτήσει της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα, χρησιμοποιώντας τη μικρορευστομηχανική κυψελίδα τύπου Γ, το αναλυτικό σήμα που ελήφθη για την κ-καζεΐνη και την πρωτεΐνη σόγιας ήταν, αντίστοιχα, περίπου 10 και 15% υψηλότερο σε σχέση με το σήμα που ελήφθη με τις άλλες δύο μικρορευστομηχανικές κυψελίδες. Επιπλέον, με τη χρήση της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας τύπου Γ, το αναλυτικό σήμα το οποίο ελήφθη από τα δέκα διαφορετικά MZIs, που είχαν βιοενεργοποιηθεί είτε με κ-καζεΐνη ή με πρωτεΐνη σόγιας παρουσίαζε σημαντικά μικρότερη διακύμανση ($CV < 6\%$) σε σχέση με το σήμα που ελήφθη χρησιμοποιώντας τις άλλες δύο κυψελίδες ($CV = 12-15\%$). Αντίστοιχα αποτελέσματα ελήφθησαν και για τη πρωτεΐνη φιστικιού και τη γλιαδίνη. Μία πιθανή εξήγηση του αποτελέσματος αυτού είναι ότι με τη συγκεκριμένη διαμόρφωση της κυψελίδας, επιτυγχάνεται πιο ομαλή ροή των διαλυμάτων πάνω από τα MZIs και πιο αποτελεσματική διάχυση των αντισωμάτων προς τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια της ψηφίδας βιομόρια.

Παράλληλα, για καθεμία από τις μικρορευστομηχανικές κυψελίδες εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές ταχύτητες ροής. Όπως προκύπτει από το σχήμα 25, αυξανόμενη της ροής μειώνεται το αναλυτικό σήμα, με τη μεγαλύτερη ταχύτητα ροής (50 $\mu\text{L}/\text{min}$) να προκαλεί σημαντική μείωση του αναλυτικού σήματος, σε σχέση με τις άλλες δύο ταχύτητες. Επιπλέον, εφαρμόζοντας ροή 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ παρατηρήθηκε μικρή πτώση του σήματος, το οποίο αντιστοιχούσε στο 90% του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για την ταχύτητα των 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, αλλά παράλληλα ο συνολικός χρόνος του προσδιορισμού ήταν σημαντικά ήταν μικρότερος (400 sec) σε σχέση με τον χρόνο που απαιτείτο όταν η ροή ήταν 30

$\mu\text{L}/\text{min}$ (500 sec). Ως εκ τούτου, υιοθετήθηκε η μικρορευστομηχανική κυψελίδα τύπου Γ για το τελικό πρωτόκολλο προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων ουσιών σε συνδυασμό με ταχύτητα ροής για τη διαβίβαση των διαλυμάτων ίση με $35 \mu\text{L}/\text{min}$.

Με τις συνθήκες που επιλέχθηκαν, ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο οι αποκρίσεις που αντιστοιχούν στο μηδενικό πρότυπο κάθε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης, οι οποίες παρουσιάζονται στο σχήμα 26. Σε όλες τις περιπτώσεις, επτά από τα 10 MZIs της ψηφίδας είχαν τροποποιηθεί με την εκάστοτε αλλεργιογόνο πρωτεΐνη και τα εναπομένοντα τρία είχαν τροποποιηθεί με BSA προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως τυφλά (σήμα μη ειδικής δέσμευσης).



Σχήμα 26: Αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν από 7 MZIs της ίδιας ψηφίδας που είχαν τροποποιηθεί με Α) κ-καζεΐνη, Β) πρωτεΐνη φιστικιού, Γ) πρωτεΐνη σόγιας ή Δ) γλιαδίνη κατά τη διαδοχική διαβίβαση: διαλύματος ανοσοαντίδρασης (αρχή→1), μίγματος μηδενικού προτύπου/ειδικών αντισωμάτων έναντι της κάθε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης (1→2) και διαλύματος δευτέρου αντισώματος (2→τέλος). Σε όλες τις περιπτώσεις τα 3 εναπομένοντα MZIs είχαν τροποποιηθεί με BSA για την λήψη του σήματος μη ειδικής δέσμευσης (τυφλό).

Όπως προκύπτει από το σχήμα, με τις συνθήκες που επιλέχθηκαν, λαμβάνεται επαρκές αναλυτικό σήμα και για τα τέσσερα αλλεργιογόνα. Πιο συγκεκριμένα, ο μέσος όρος του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για την κ-καζεΐνη ήταν 1,45, για την πρωτεΐνη φιστικιού 1,25, για την πρωτεΐνη σόγιας 1,39 και για τη γλιαδίνη 1,6. Επιπλέον, η αναλυτική διακύμανση μεταξύ των επτά διαφορετικών κυματοδηγών ήταν μικρότερη από 6% για όλες τις πρωτεΐνες.

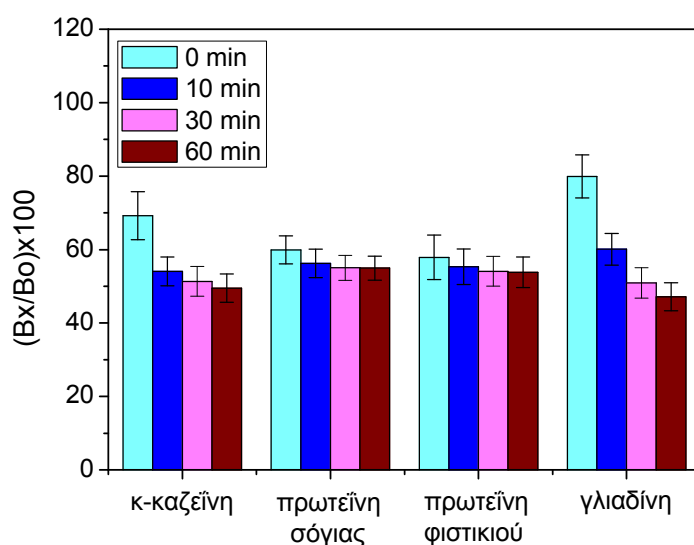
7.2.7 Διερεύνηση της επίδρασης της προεπώασης στον ανοσοχημικό προσδιορισμό με οπτικό ανοσοαισθητήρα

Κατά την ανάπτυξη των ανοσοχημικών προσδιορισμών για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες σε φρεάτια μικροπιλοδότησης βρέθηκε ότι η ευαισθησία της ανίχνευσης βελτιωνόταν σημαντικά μετά από προεπώαση των πρότυπων διαλυμάτων των πρωτεϊνών με τα αντίστοιχα αντισώματα για μία ώρα. Δεδομένου ότι για την ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών με τον οπτικό οπτικού ανοσοαισθητήρα, οι βέλτιστες συγκεντρώσεις τόσο των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη των ψηφίδων όσο και των ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτών είναι διαφορετικές από τις αντίστοιχες που προσδιορίστηκαν για τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου, ήταν απαραίτητο να μελετηθεί εκ νέου η επίδραση της προεπώασης των προτύπων διαλυμάτων με τα ειδικά αντισώματα έναντι των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Για το σκοπό αυτό, διαβιβάστηκαν πάνω από τις βιοενεργοποιημένες ψηφίδες πυριτίου μίγματα προτύπων διαλυμάτων για την κάθε αλλεργιογόνο πρωτεΐνη και ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτών σε αναλογία 1:1 τα οποία είχαν υποστεί προεπώαση για 10 min, 30 min και 60 min, και συγκρίθηκαν οι αποκρίσεις με αυτές που ελήφθησαν όταν δεν είχε γίνει προεπώαση (Σχήμα 29).

Όπως φαίνεται στο σχήμα 27 για την κ-καζεΐνη, ο χρόνος προεπώασης των 10 min βελτίωνε σημαντικά την ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης (15% επιπλέον εκτόπιση για το πρότυπο συγκέντρωσης 0,5 µg/mL σε κ-καζεΐνη) σε σχέση με την αντίστοιχη χωρίς προεπώαση, ενώ για τους μεγαλύτερους χρόνους προεπώασης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Για την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας δεν παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας της καμπύλης με την προεπώαση. Στην περίπτωση της γλιαδίνης, προεπώαση 10 min οδήγούσε σε σημαντική βελτίωση της ευαισθησίας της καμπύλης βαθμονόμησης (20% επιπλέον εκτόπιση για το πρότυπο συγκέντρωσης

0,5 µg/mL σε γλιαδίνη) σε σχέση με την αντίστοιχη χωρίς προεπώαση, ενώ η αύξηση του χρόνου προεπώασης από 10 min σε 30 min οδηγούσε σε περαιτέρω βελτίωση της ευαισθησίας (επιπλέον 10% εκτόπιση). Για αύξηση του χρόνου προεπώασης από τα 30 min 60 min η επίδραση στην ευαισθησία ήταν αμελητέα ($\leq 2\%$).

Στοχεύοντας στον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τεσσάρων πρωτεϊνών επιλέχθηκε χρόνος προεπώασης 10 min, ο οποίος φαίνεται να βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία της καμπύλης για τις δύο από τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες χωρίς να επηρεάζει τις υπόλοιπες δύο.

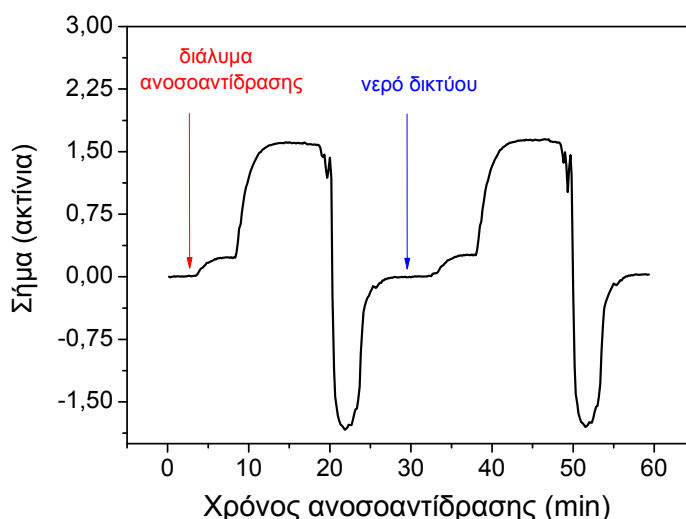


Σχήμα 27: Τιμές επί τοις εκατό ποσοστιαίας εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης: 0,5 µg/mL σε κ-καζεΐνη, 6 µg/mL σε πρωτεΐνη φιστικιού, 4 µg/mL σε πρωτεΐνη σόγιας και 0,5 µg/mL σε γλιαδίνη ως προς τα αντίστοιχα μηδενικά πρότυπα όταν δεν έχει πραγματοποιηθεί προεπώαση των προτύπων διαλυμάτων με τα ειδικά έναντι των πρωτεϊνών αντισώματα (■) ή όταν έχει πραγματοποιηθεί προεπώαση για 10 min (■), 30 min (■) ή για 60 min (■). Κάθε στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

7.2.8 Διερεύνηση της επίδρασης της μήτρας του δείγματος στον ανοσοχημικό προσδιορισμό με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα

Δεδομένου ότι ο τελικός στόχος του οπτικού ανοσοαισθητήρα είναι ο ταυτόχρονος ανοσοχημικός προσδιορισμός των τεσσάρων αλλεργιογόνων σε δείγματα από νερό έκπλυσης των σωληνώσεων της βιομηχανίας τροφίμων ελέγχθηκε η επίδραση της μήτρας των δειγμάτων στον ανοσοαισθητήρα, όπως

πραγματοποιήθηκε και για τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου (εδάφιο 7.1.6). Στην περίπτωση του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού βρέθηκε ότι δεν υπήρχε αρνητική επίδραση από τη μήτρα των δειγμάτων νερού τόσο στη λειτουργικότητα του αντισώματος όσο και στην ανοσοαντίδραση. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή ο προσδιορισμός δεν πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο και χωρίς τη χρήση ιχνηθετών όπως στον αισθητήρα. Για τον λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί η επίδραση της μήτρας των δειγμάτων νερού στην απόκριση του αισθητήρα. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε νερό δικτύου, τα οποία αναμείχθηκαν με τα αντίστοιχα ειδικά αντισώματα σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης σε αναλογία 1:1 και προεπιτάστηκαν για 10 min. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μετά την διαβίβαση αυτών των μιγμάτων συγκρίθηκαν τόσο ως προς το αναλυτικό σήμα όσο και ως προς την ευαισθησία των καμπυλών βαθμονόμησης με εκείνα που ελήφθησαν όταν για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων είχε χρησιμοποιηθεί διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Στο σχήμα 28 παρουσιάζεται ενδεικτικά για τη γλιαδίνη, η απόκριση που ελήφθη σε πραγματικό χρόνο με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα μετά από διαβίβαση του μηδενικού προτύπου που είχε παρασκευαστεί σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης καθώς και μηδενικού προτύπου σε νερό δικτύου.



Σχήμα 28: Απόκριση που ελήφθη σε πραγματικό χρόνο για μηδενικό πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης που είχε παρασκευαστεί σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης (κόκκινο βέλος) ή σε νερό δικτύου (μπλε βέλος).

Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε η ίδια ψηφίδα μετά από αναγέννηση. Σύμφωνα με το σχήμα, δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση του νερού δικτύου

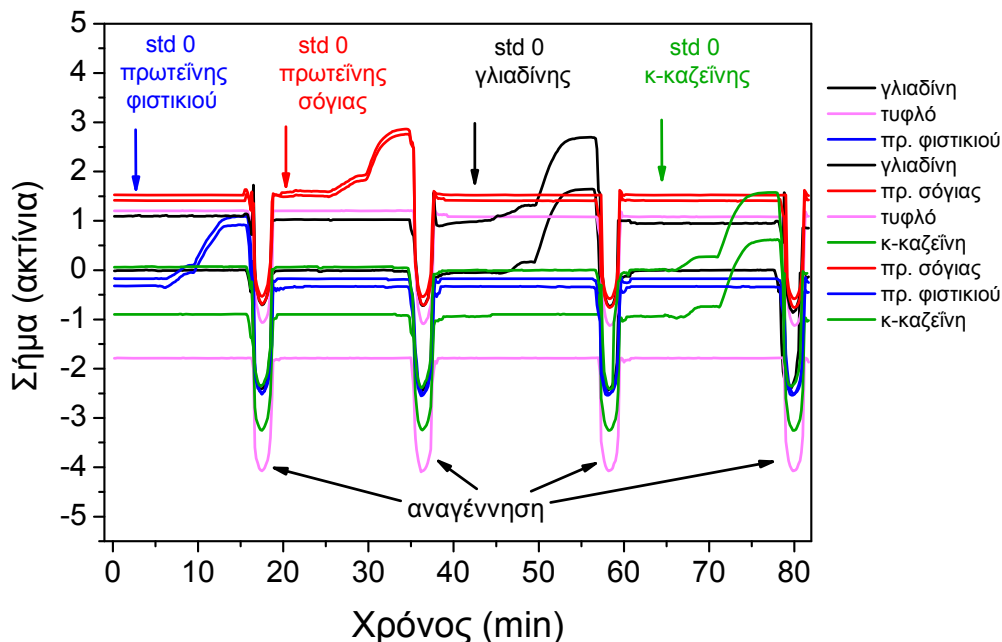
στο αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα γλιαδίνης. Επιπλέον, τα αναλυτικά σήματα που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα γλιαδίνης σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης ήταν παρεμφερή με εκείνα που ελήφθησαν για τα αντίστοιχα διαλύματα σε νερό δικτύου. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας. Ως εκ τούτου, επιλέχθηκε ως μέσο για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων το διάλυμα ανοσοαντίδρασης κατά την ανάλυση δειγμάτων σε δείγματα νερού έκπλυσης σωληνώσεων βιομηχανίας τροφίμων προκειμένου να εξασφαλιστεί η σταθερότητα των διαλυμάτων των πρωτεϊνών κατά τη φύλαξη.

7.2.9 Ταυτόχρονος προσδιορισμός των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών

Μετά την ολοκλήρωση της βελτιστοποίησης του ανοσοχημικού προσδιορισμού της κάθε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα, ελέγχθηκε η δυνατότητα του ταυτόχρονου προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στην ίδια ψηφίδα. Αρχικά διερευνήθηκε εάν υπάρχει αλληλεπίδραση των ειδικών αντισωμάτων για καθεμιά πρωτεΐνη με τις υπόλοιπες τρεις δηλαδή ελέγχθηκε η ειδικότητα των αντισωμάτων. Για το σκοπό αυτό, δύο κυματοδηγοί της ίδιας ψηφίδας τροποποιήθηκαν με εναπόθεση διαλύματος συγκέντρωσης 100 µg/mL καθεμιάς από τις τέσσερις πρωτεΐνες, ενώ οι δύο εναπομένοντες κυματοδηγοί τροποποιήθηκαν με BSA προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως τυφλά. Στο σχήμα 29 παρουσιάζονται οι αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της διαβίβασης διαδοχικά πάνω από την επιφάνεια του αισθητήρα, μίγματος μηδενικού προτύπου/ειδικών αντισωμάτων έναντι της κάθε αλλεργιογόνου πρωτεΐνης ακολουθούμενη από το αντίστοιχο διάλυμα δευτέρου αντισώματος. Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης για κάθε πρωτεΐνη και πριν τη διαβίβαση των διαλυμάτων για την επόμενη πραγματοποιήθηκε αναγέννηση της επιφάνειας.

Όπως προκύπτει από το σχήμα, οι αποκρίσεις που ελήφθησαν κατά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τεσσάρων αλλεργιογόνων ήταν παρεμφερείς με εκείνες που ελήφθησαν για τον προσδιορισμό της κάθε πρωτεΐνης μεμονωμένα (Σχήμα 26). Επιπρόσθετα, για κάθε αλλεργιογόνο πρωτεΐνη απόκριση ελήφθη μόνο από τα MZIs τα οποία είχαν τροποποιηθεί με την αντίστοιχη αλλεργιογόνο πρωτεΐνη, υποδεικνύοντας ότι δεν υπήρχε καμία αλληλεπίδραση των αντισωμάτων της μίας αλλεργιογόνου πρωτεΐνης με τις υπόλοιπες. Ως εκ τούτου, ο

ανοσοαισθητήρας που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής είναι κατάλληλος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στο ίδιο δείγμα.

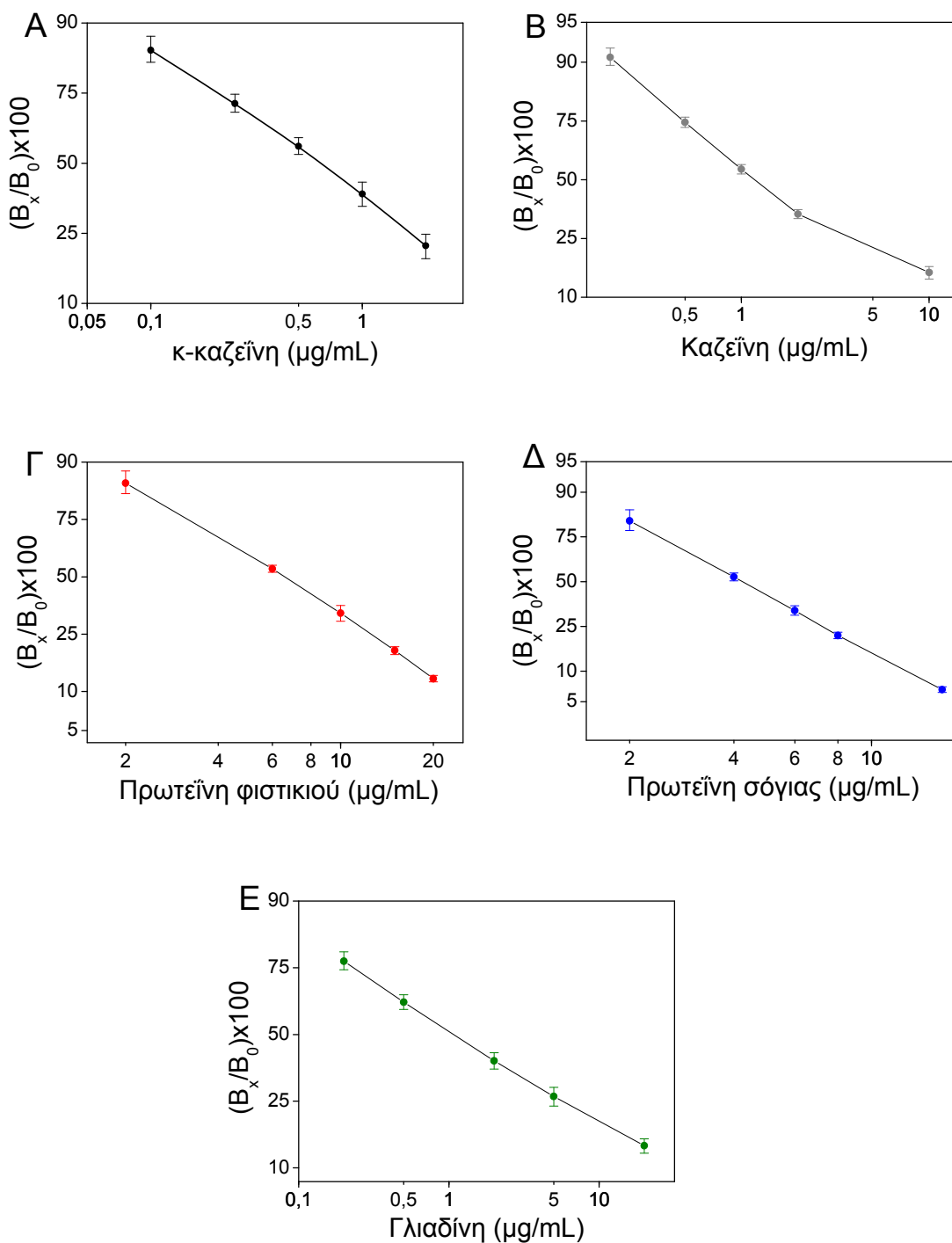


Σχήμα 29: Αποκρίσεις που ελήφθησαν από ψηφίδα στην οποία κυματοδηγοί είχαν τροποποιηθεί ανά δύο με καθεμία από τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες ή BSA όπως φαίνεται στην λεζάντα κατά την διαδοχική διαβίβαση των αντίστοιχων μηδενικών προτύπων (άνω βέλη). Μεταξύ των διαφορετικών μηδενικών προτύπων πραγματοποιείται αναγέννηση της επιφάνειας της ψηφίδας (κάτω βέλη).

7.2.10 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ταυτόχρονου ανοσοχημικού προσδιορισμού της κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα

Ακολουθώντας το τελικό πρωτόκολλο του ανοσοχημικού προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα, το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 6.9, ελήφθησαν καμπύλες βαθμονόμησης για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού, την πρωτεΐνη σόγιας και την γλιαδίνη οι οποίες παρουσιάζονται στα σχήματα 30 Α, Γ, Δ και Ε, αντίστοιχα. Επιπλέον, στο σχήμα 30 Β παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης που ελήφθη όταν για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ολική καζεΐνη. Η καμπύλη αυτή κατασκευάστηκε προκειμένου η συγκέντρωση καζεΐνης που θα

προσδιοριστεί στα δείγματα να εκφραστεί απευθείας σε ολικής καζεΐνη αντί της κ-καζεΐνης.



Σχήμα 30: Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης ανοσοχημικού προσδιορισμού της: **A)** κ-καζεΐνης, **B)** ολικής καζεΐνης, **Γ)** πρωτεΐνης φιστικιού, **Δ)** πρωτεΐνης σόγιας και **Ε)** γλιαδίνης, με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 2 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ταυτόχρονου ανοσοχημικού προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) για την κάθε πρωτεΐνη προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε επί τοις εκατό ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος 100-3SD και 100-6SD, αντίστοιχα, 20 μετρήσεων του μηδενικού προτύπου, που προέκυψαν από δέκα διαδοχικούς κύκλους ανοσοανάλυσης με την ίδια ψηφίδα πυριτίου. Επίσης προσδιορίστηκε για κάθε πρωτεΐνη, η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με 50% ως προς το σήμα του μηδενικού προτύπου, η οποία αποτελεί τη τιμή IC₅₀. Για τον προσδιορισμό των συντελεστών διακύμανσης της μέσης τιμής των μετρήσεων (CV%) του ανοσοχημικού προσδιορισμού με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα, παρασκευάστηκαν τρία δείγματα ελέγχου με προσθήκη τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων καθεμίας από τις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες σε νερό δικτύου. Η ένδο-αναλυτική επαναληψιμότητα υπολογίστηκε από τις συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν για τα δείγματα ελέγχου μετά από μέτρηση των τριών δειγμάτων ελέγχου με τέσσερις διαφορετικές ψηφίδες μέσα στην ίδια μέρα, ενώ η διαναλυτική επαναληψιμότητα υπολογίστηκε από τις συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν για τα δείγματα ελέγχου μετά από μέτρηση των τριών δειγμάτων ελέγχου με δύο ψηφίδες πυριτίου ανά ημέρα σε οχτώ διαφορετικές ημέρες και σε διάστημα ενός μήνα.

Πίνακας 5: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ταυτόχρονου ανοσοχημικού προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.

	κ-Καζεΐνη	Ολική καζεΐνη	Πρωτεΐνη φιστικιού	Πρωτεΐνη σόγιας	Γλιαδίνη
LOD (µg/mL)	0,030	0,080	1,0	0,80	0,10
LOQ (µg/mL)	0,090	0,17	2,0	1,5	0,20
IC50 (µg/mL)	0,64	1,2	7,2	4,5	1,1
Δυναμικό εύρος (µg/mL)	0,10-2,0	0,20-10	2,0-20	2,0-16	0,20-20
Ένδο-αναλυτικό CV (%)	2,8-4,1	3,0-4,4	3,3-5,1	3,5-5,4	2,9-4,9
Διαναλυτικό CV (%)	3,4-5,8	3,2-4,9	3,5-6,2	3,8-6,5	3,2-5,8

Για την αξιολόγηση της ακρίβειας του προσδιορισμού των τεσσάρων αλλεργιογόνων με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης και γραμμικότητας αραίωσης. Στα πειράματα ανάκτησης

χρησιμοποιήθηκε νερό δικτύου καθώς και τρία δείγματα νερού έκπλυσης μηχανών από το τελικό στάδιο καθαρισμού των γραμμών παραγωγής της βιομηχανίας ΔΕΛΤΑ. Στα δείγματα αυτά πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών τόσο με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροπιλοδότησης όσο και με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Και με τις δύο μεθόδους βρέθηκε ότι τα δείγματα αυτά ήταν ελεύθερα αλλεργιογόνων. Ακολούθησε προσθήκη των τεσσάρων πρωτεϊνών σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, εντός του δυναμικού εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης της κάθε πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, οι προστεθείσες συγκεντρώσεις ήταν 0,4 µg/mL, 1,2 µg/mL και 3,6 µg/mL για την καζεΐνη, 4 µg/mL, 8 µg/mL και 16 µg/mL για την πρωτεΐνη φιστικιού, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL και 10 µg/mL για την πρωτεΐνη σόγιας και 0,3 µg/mL, 1,5 µg/mL και 7,5 µg/mL για τη γλιαδίνη. Στους πίνακες 6, 7, 8 και 9 παρουσιάζεται η μέση τιμή των συγκεντρώσεων που προσδιορίστηκε στα δείγματα που προέκυψαν μετά την προσθήκη των προαναφερθέντων συγκεντρώσεων των τεσσάρων πρωτεϊνών.

Όπως προκύπτει από τους πίνακες 6, 7, 8 και 9, η επί τοις εκατό ανάκτηση και για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες κυμαινόταν από 88% έως 118%, καταδεικνύοντας την ακρίβεια των μετρήσεων που πραγματοποιούνται με τον οπτικό αισθητήρα.

Πίνακας 6: Επί τοις εκατό ανάκτηση εξωγενώς προστεθείσας καζεΐνης σε δείγμα νερού δικτύου και δείγματα από εκπλυστικές μηχανές

καζεΐνη δείγμα	Ενδογενής συγκέντρωση (µg/mL)	Προστεθείσα συγκέντρωση (µg/mL)	Προσδιορισθείσα συγκέντρωση (µg/mL)	Ανάκτηση (%)
νερό δικτύου	0	0,40	0,37±0,010	93
		1,20	1,2±0,030	97
		3,60	4,1±0,15	113
μηχανή SIN-A	0	0,40	0,39±0,020	97
		1,20	1,1±0,040	91
		3,60	3,2±0,16	88
μηχανή SIN-B	0	0,40	0,41±0,020	102
		1,20	1,1±0,030	95
		3,60	3,7±0,18	104
μηχανή PLA-1	0	0,40	0,36±0,020	89
		1,20	1,31±0,03	109
		3,60	3,4±0,15	93

Πίνακας 7: Επί τοις εκατό ανάκτηση εξωγενώς προστεθείσας πρωτεΐνης φιστικιού σε δείγμα νερού δικτύου και δείγματα από εκπλυστικές μηχανές

πρωτεΐνη φιστικιού δείγμα	Ενδογενής συγκέντρωση (μg/mL)	Προστεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Προσδιορισθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
νερό δικτύου	0	4	4,2±0,20	106
		8	7,0±0,20	88
		16	16±0,60	97
μηχανή SIN-A	0	4	3,8±0,20	94
		8	7,4±0,30	93
		16	14±0,50	90
μηχανή SIN-B	0	4	3,6±0,10	91
		8	8,8±0,40	110
		16	17±0,70	108
μηχανή PLA-1	0	4	3,6±0,10	90
		8	8,4±0,30	105
		16	14±0,60	89

Πίνακας 8: Επί τοις εκατό ανάκτηση εξωγενώς προστεθείσας πρωτεΐνης σόγιας σε δείγμα νερού δικτύου και δείγματα από εκπλυστικές μηχανές

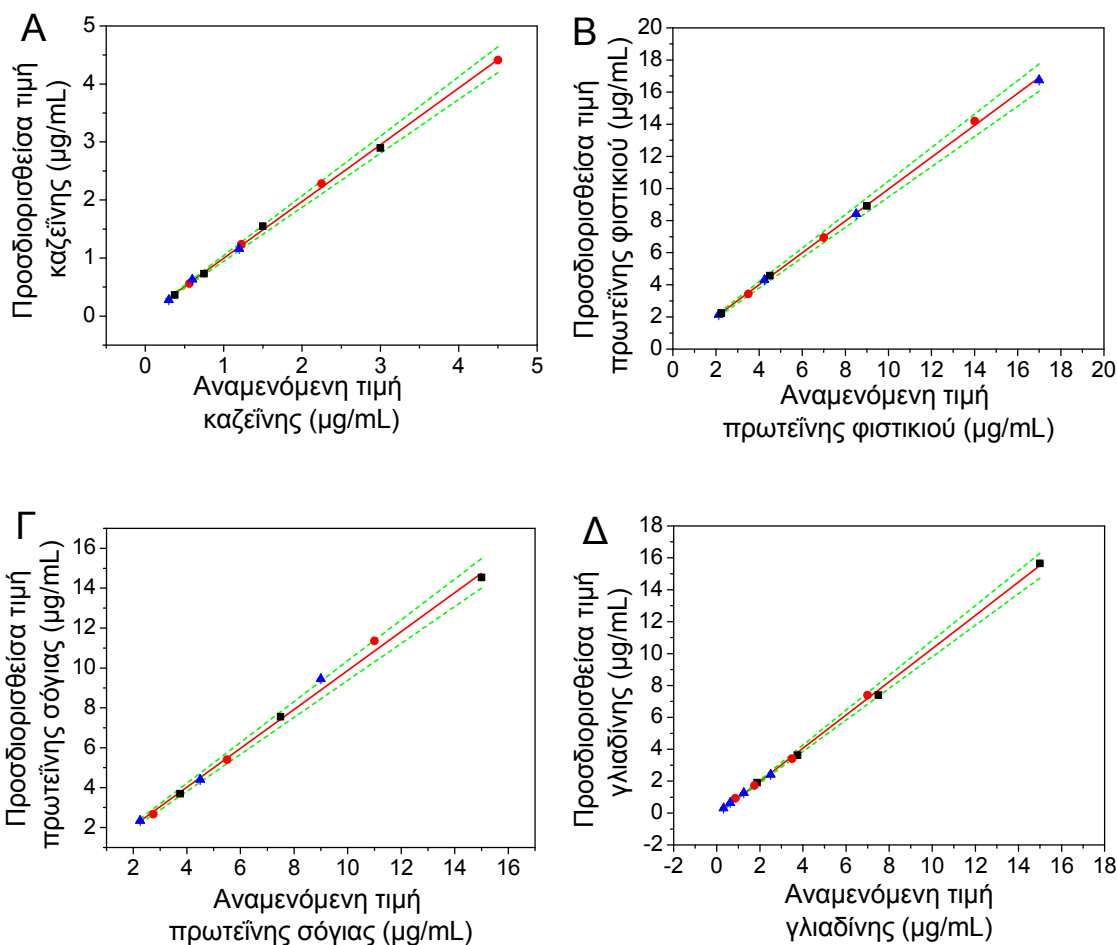
πρωτεΐνη σόγιας δείγμα	Ενδογενής συγκέντρωση (μg/mL)	Προστεθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Προσδιορισθείσα συγκέντρωση (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
νερό δικτύου	0	2,5	2,4±0,10	97
		5	4,9±0,18	98
		10	8,7±0,35	87
μηχανή SIN-A	0	2,5	2,6±0,10	104
		5	4,5±0,18	89
		10	9,2±0,33	92
μηχανή SIN-B	0	2,5	2,3±0,090	91
		5	4,8±0,21	95
		10	11±0,4	110
μηχανή PLA-1	0	2,5	2,2±0,080	89
		5	5,2±0,21	104
		10	9,3±0,37	93

Πίνακας 9: Επί τοις εκατό ανάκτηση εξωγενώς προστεθείσας γλιαδίνης σε δείγμα νερού δικτύου και δείγματα από εκπλυστικές μηχανές

γλιαδίνη δείγμα	Ενδογενής συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Προστεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Προσδιορισθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Ανάκτηση (%)
νερό δικτύου	0	0,30	$0,28 \pm 0,010$	94
		1,5	$1,3 \pm 0,040$	86
		7,5	$6,9 \pm 0,26$	92
μηχανή SIN-A	0	0,30	$0,26 \pm 0,020$	89
		1,5	$1,4 \pm 0,050$	91
		7,5	$8,7 \pm 0,36$	116
μηχανή SIN-B	0	0,30	$0,30 \pm 0,010$	100
		1,5	$1,4 \pm 0,050$	94
		7,5	$7,7 \pm 0,31$	103
μηχανή PLA-1	0	0,30	$0,31 \pm 0,010$	102
		1,5	$1,4 \pm 0,050$	94
		7,5	$6,8 \pm 0,28$	91

Για το πείραμα της γραμμικότητας αραίωσης παρασκευάστηκαν αρχικά σε νερό δικτύου τρία δείγματα που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις καθεμιάς από τις τέσσερις πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις που προστέθηκαν ήταν για την καζεΐνη 4,5, 3, 1,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, για την πρωτεΐνη φιστικιού 17, 14, 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, για την πρωτεΐνη σόγιας 15, 11, 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και για την γλιαδίνη 15, 7, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα δείγματα αυτά αραιώθηκαν διαδοχικά με διάλυμα ανοσοαντίδρασης έτσι ώστε τα δείγματα που προκύπτουν να έχουν συγκεντρώσεις εντός των περιοχών γραμμικής απόκρισης των αντίστοιχων καμπυλών βαθμονόμησης. Στο σχήμα 31 Α, Β, Γ και Δ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος γραμμικότητας αραίωσης για την κάθε αλλεργιογόνο πρωτεΐνη χωριστά ως συσχέτιση μεταξύ των αναμενόμενων και των προσδιορισθέντων τιμών. Επιπλέον, στον πίνακα 10 παρουσιάζονται οι κλίσεις (α), οι τεταγμένες επί την αρχή (β), και οι συντελεστές συσχέτισης των αντίστοιχων ευθειών παλινδρόμησης.

Όπως προκύπτει από τα σχήματα αλλά και από τις ευθείες παλινδρόμησης, κατά τον έλεγχο της γραμμικότητας της αραίωσης των δειγμάτων, οι προσδιορισθείσες τιμές ήταν σε πλήρη συμφωνία με τις αναμενόμενες τιμές.



Σχήμα 31: Συσχέτιση των αναμενόμενων συγκεντρώσεων με τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις: Α) καζεΐνης που ελήφθησαν με διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων των οποίων η αρχική συγκέντρωση ήταν 4,5 μg/mL (■), 3,0 μg/mL (●) και 1,2 μg/mL (▲), Β) πρωτεΐνης φιστικιού όταν η αρχική συγκέντρωση ήταν: 17 μg/mL (■), 14 μg/mL (●) και 9 μg/mL (▲), Γ) πρωτεΐνης σόγιας όταν η αρχική συγκέντρωση ήταν: 15 μg/mL (■), 11 μg/mL (●) και 9 μg/mL (▲) και Δ) γλιαδίνης όταν η αρχική συγκέντρωση ήταν: 15 μg/mL (■), 7 μg/mL (●) και 2,5 μg/mL (▲) . Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 2 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Πίνακας 10: Κλίσεις (α), τεταγμένες επί την αρχή (β), και συντελεστές συσχέτισης των ευθειών παλινδρόμησης που προέκυψαν από το πείραμα γραμμικότητας αραιώσης για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες

	α	β	r ²
καζεΐνη	0,979±0,0100	0,016±0,012	0,998
πρωτεΐνη φιστικιού	0,993±0,00820	0,028±0,071	0,9993
πρωτεΐνη σόγιας	0,975±0,0100	0,119±0,0800	0,9991
γλιαδίνη	1,041±0,0110	-0,099±0,062	0,998

7.2.11 Ανάλυση δειγμάτων με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα και σύγκριση με τους αντίστοιχους ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα αξιολογήθηκε επίσης με ανάλυση δειγμάτων νερού έκπλυσης των γραμμών παραγωγής της γαλακτοβιομηχανίας ΔΕΛΤΑ, τα οποία συλλέχθηκαν τόσο μετά το πρώτο όσο και μετά από το τελικό στάδιο έκπλυσης. Επιπλέον, αναλύθηκαν βαμβακοφόροι στείλεοί (swabs) που παραχωρήθηκαν από την εταιρεία EUROFINS. Στους πίνακες 11 και 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για δείγματα νερού από το τελικό στάδιο έκπλυσης επτά διαφορετικών μηχανών, δείγματα νερού από το πρώτο στάδιο έκπλυσης που ελήφθησαν από έξι διαφορετικές μηχανές, καθώς επίσης και για τρεις βαμβακοφόρους στείλεούς.

Για την ανάκτηση της καζεΐνης και της γλιαδίνης από τους βαμβακοφόρους στείλεούς πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με διάλυμα ανοσοαντίδρασης όγκου 1 mL για 30 min. Στις περιπτώσεις που η συγκέντρωση των δειγμάτων υπερέβαινε το δυναμικό εύρος των καμπυλών βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκε αραιώση με διάλυμα ανοσοαντίδρασης.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους πίνακες 11 και 12, τα δείγματα που προήλθαν από το τελικό στάδιο καθαρισμού των εγκαταστάσεων της γαλακτοβιομηχανίας δεν περιείχαν τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από μετρήσεις που διεξήγαγε η γαλακτοβιομηχανία ΔΕΛΤΑ στα ίδια δείγματα μετά από αποστολή τους σε ανεξάρτητο εξωτερικό εργαστήριο. Αντίθετα τα δείγματα που προήλθαν από το πρώτο στάδιο καθαρισμού των εγκαταστάσεων της ίδιας γαλακτοβιομηχανίας περιείχαν τις τέσσερις πρωτεΐνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν σε δείγματα αυτά με τον οπτικό αισθητήρα ήταν σε συμφωνία με εκείνες που προσδιορίστηκαν για τα ίδια δείγματα με τους αντίστοιχους ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Τα δείγματα αυτά δεν αναλύθηκαν από ανεξάρτητο εξωτερικό εργαστήριο. Όσον αφορά τους βαμβακοφόρους στείλεούς, αντιδείγματα αναλύθηκαν από την εταιρεία EUROFINS με χρήση εμπορικά διαθέσιμης συσκευασίας ανοσοχημικού προσδιορισμού (RIDASCREEN) και οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν ήταν σε καλή συμφωνία με τις αντίστοιχες που προσδιορίστηκαν τόσο με τον οπτικό αισθητήρα όσο και με τους αντίστοιχους

ανοσοενζυμικούς προσδιορισμούς σε φρεάτια μικροπιλοδότησης που αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

Συνεπώς, ο οπτικός ανοσοαισθητήρας είναι κατάλληλος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε δείγματα νερού έκπλυσης από βιομηχανικές εγκαταστάσεις αλλά και σε βαμβακοφόρους στειλεούς.

Πίνακας 11: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις καζεΐνης και γλιαδίνης σε δείγματα που αναλύθηκαν με τους αντίστοιχους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς ανταγωνιστικού τύπου (ELISA) και τον οπτικό ανοσοαισθητήρα

Δείγματα	Καζεΐνη (μg/mL)		Γλιαδίνη (μg/mL)	
	ELISA	Αισθητήρας	ELISA	Αισθητήρας
SIN-A	0	0	0	0
SIN-B	0	0	0	0
PLA-1	0	0	0	0
PLA-2	0	0	0	0
AG-A	0	0	0	0
AG-B	0	0	0	0
AG-C	0	0	0	0
A	0,89±0,014	0,85±0,034	1,2±0,017	1,2±0,059
B	1,2±0,022	1,2±0,045	0	0
Γ	0,56±0,015	0,52±0,020	0,86±0,010	0,89±0,040
Δ	0,98±0,020	0,99±0,034	0,66±0,050	0,62±0,024
E	1,2±0,020	1,3±0,051	0,24±0,0041	0,24±0,0092
Z	0,80±0,012	0,77±0,030	0	0
Swab 1	0,24±0,026	0,25±0,0096	7,9±0,16	8,2±0,29
Swab 2	1,4±0,025	1,3±0,051	2,4±0,046	2,4±0,094
Swab 3	2,6±0,052	2,6±0,10	4,6±0,083	4,6±0,18

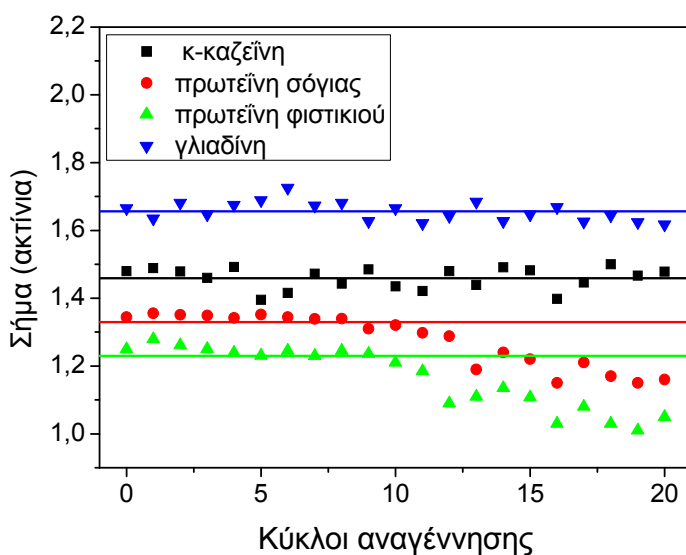
Πίνακας 12: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης φιστικιού και πρωτεΐνης σόγιας σε δείγματα που αναλύθηκαν με τους αντίστοιχους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς ανταγωνιστικού τύπου (ELISA) και τον οπτικό ανοσοαισθητήρα

Δείγματα	Πρωτεΐνη φιστικιού		Πρωτεΐνη σόγιας	
	ELISA	Αισθητήρας	ELISA	Αισθητήρας
SIN-A	0	0	0	0
SIN-B	0	0	0	0
PLA-1	0	0	0	0
PLA-2	0	0	0	0
AG-A	0	0	0	0
AG-B	0	0	0	0
AG-C	0	0	0	0
A	2,2±0,044	2,3±0,086	0	0
B	0,18±0,0020	0	4,8±0,090	4,8±0,23
Γ	3,4±0,068	3,4±0,15	0	0
Δ	3,9±0,057	4,0±0,20	2,9±0,053	2,9±0,12
E	2,4±0,046	2,5±0,12	0	0
Z	0	0	0	0
Swab 1	0	0	0	0
Swab 2	0	0	0	0
Swab 3	0	0	0	0

7.2.12 Αναγέννηση των ψηφίδων και σταθερότητά τους κατά τη φύλαξη

Η δυνατότητα αναγέννησης και επαναχρησιμοποίησης των βιοενεργοποιημένων ψηφίδων είναι μείζονος σημασίας γιατί επιτρέπει την πραγματοποίηση διαδοχικών μετρήσεων και την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων με την ίδια ψηφίδα ελαχιστοποιώντας το κόστος της ανάλυσης. Χρησιμοποιώντας ως διάλυμα αναγέννησης HCl 50 mM, που είχε επιλεγεί σε προηγούμενα πειράματα βελτιστοποίησης (εδάφιο 7.2.2), βελτιστοποιήθηκε η χρονική διάρκεια του σταδίου της αναγέννησης. Για τον σκοπό αυτό, μετά την ολοκλήρωση της διαβίβασης

μιγμάτων μηδενικού προτύπου διαλύματος/ειδικών αντισωμάτων έναντι των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε διέλευση διαλύματος αναγέννησης για χρόνους 1, 3 και 5 min από τη βιοενεργοποιημένη ψηφίδα πυριτίου και διαπιστώθηκε ότι το επί τοις εκατό ποσοστό των αντισωμάτων που παραμένει στην επιφάνεια (υπόλειμμα) ήταν σταθερό για χρόνους αναγέννησης ≥ 3 min. Ως εκ τούτου, η διαδικασία αναγέννησης των βιοενεργοποιημένων με τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες ψηφίδων περιελάμβανε διαβίβαση από την ψηφίδα διαλύματος HCl 50 mM για 3 min. Ακολουθώντας την βέλτιστη διαδικασία αναγέννησης, προσδιορίστηκε ο μέγιστος αριθμός κύκλων ανοσοανάλυσης/αναγέννησης που μπορεί να πραγματοποιηθεί με μία βιοενεργοποιημένη ψηφίδα (Σχήμα 32).



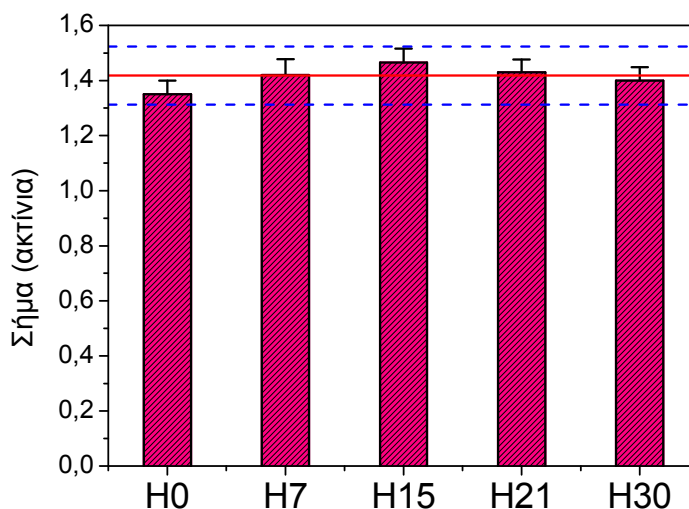
Σχήμα 32: Τιμές που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης (■), πρωτεΐνης σόγιας (●), πρωτεΐνης φιστικιού (▲) και γλιαδίνης (▼), αντίστοιχα, σε επαναλαμβανόμενους κύκλους ανοσοανάλυσης/αναγέννησης. Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή των είκοσι μετρήσεων για την κ-καζεΐνη και τη γλιαδίνη και των δώδεκα πρώτων μετρήσεων για την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 32, ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί με κ-καζεΐνη και γλιαδίνη ήταν δυνατόν να αναγεννηθούν και επαναχρησιμοποιηθούν για τουλάχιστον 20 διαφορετικές μετρήσεις με τις μέσες τιμές σήματος μηδενικού προτύπου να είναι $1,46 \pm 0,032$ και $1,66 \pm 0,0280$ ακτίνια, για την κ-καζεΐνη και τη γλιαδίνη, αντίστοιχα, και όλες οι τιμές να βρίσκονται μεταξύ των ορίων μέσης τιμής $\pm 2SD$. Αντίθετα, στην περίπτωση της πρωτεΐνης φιστικιού και της πρωτεΐνης

σόγιας η αναγέννηση παρείχε παρόμοιες τιμές σήματος για τις δώδεκα πρώτες επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, με μέση τιμή αναλυτικού σήματος $1,24 \pm 0,024$ ακτίνια και $1,29 \pm 0,066$ ακτίνια, αντίστοιχα. Περαιτέρω κύκλοι ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης είχαν ως αποτέλεσμα σταδιακή πτώση του σήματος η οποία μετά από 20 κύκλους ανερχόταν στο 15% και το 10% του αρχικού σήματος για την για την πρωτεΐνη φιστικιού και πρωτεΐνη σόγιας, αντίστοιχα.

Προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα των βιοενεργοποιημένων ψηφίδων πυριτίου κατά τη φύλαξη, ψηφίδες τροποποιημένες με τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες οι οποίες είχαν κατεργαστεί με διάλυμα αποκλεισμού, εκπλύθηκαν, ξηράνθηκαν σε ρεύμα αζώτου και διατηρήθηκαν σε ξηραντήρα στους 4°C . Οι ψηφίδες αυτές ελέγχθηκαν σε διάστημα ενός μήνα. Στο σχήμα 33 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι τιμές που ελήφθησαν για την καζεΐνη.

Όπως φαίνεται, οι τροποποιημένες ψηφίδες πυριτίου ήταν σταθερές για τουλάχιστον ένα μήνα. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και για τις υπόλοιπες τρεις πρωτεΐνες.



Σχήμα 33: Τιμές που ελήφθησαν για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα κ-καζεΐνης σε διάστημα ενός μήνα (όπου H συμβολίζεται η διαφορετική ημέρα που ελέγχθηκε η ψηφίδα πυριτίου στο διάστημα αυτό) με ψηφίδες που είχαν τροποποιηθεί και φυλαχθεί στους 4°C . Κάθε στήλη αντιστοιχεί στη μέση τιμή 10 επαναληπτικών μετρήσεων $\pm\text{SD}$.

7.3 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου ανοσοενζυμικού προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα σε φρεάτια μικροτιλοδότησης και οπτικό ανοσοαισθητήρα

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της κατανάλωσης του κασικίσιου γάλακτος παγκοσμίως η οποία οφείλεται αφενός στην υψηλή διατροφική του αξία και αφετέρου στην μεγαλύτερη ευκολία πέψης και την πρόκληση λιγότερων αλλεργικών αντιδράσεων σε σχέση με το αγελαδινό γάλα. Η υψηλότερη τιμή πώλησης του κασικίσιου γάλακτος σε συνδυασμό με την εποχιακή του διαθεσιμότητα και την περιορισμένη παραγωγή του, το καθιστούν ελκυστικό για νοθεία. Η νοθεία του κασικίσιου γάλακτος πραγματοποιείται κυρίως με αγελαδινό γάλα ή με ορό τυριού. Η ανίχνευση της νοθείας είναι σημαντική τόσο για την προστασία των καταναλωτών που παρουσιάζουν αλλεργία στο αγελαδινό γάλα όσο και για τις βιομηχανίες τροφίμων, οι οποίες είναι υποχρεωμένες σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία να δηλώνουν στις συσκευασίες το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των γαλακτοκομικών προϊόντων. Ανάλογα προβλήματα νοθείας παρουσιάζονται και στην περίπτωση του πρόβειου γάλακτος, το οποίο δεν προορίζεται τόσο για απευθείας κατανάλωση, αλλά για την παραγωγή αρκετών γαλακτοκομικών προϊόντων που χαρακτηρίζονται ως ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης) και δεν πρέπει να περιέχουν αγελαδινό γάλα πάνω από ορισμένα όρια.

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μέθοδος για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο και πρόβειο με το τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Για τον σκοπό αυτό, αρχικά αναπτύχθηκε ανοσοενζυμικός προσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε φρεάτια μικροτιλοδότησης, ο οποίος βασίστηκε στο πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό βοείου κ-καζεΐνης που περιγράφηκε στο εδάφιο 7.1. Στην συνέχεια, αναπτύχθηκε και ανοσοενζυμικός προσδιορισμός μη ανταγωνιστικού τύπου (sandwich) προκειμένου να διερευνηθεί ποιός από τους δύο τύπους θα προσέφερε την υψηλότερη ευαισθησία ανίχνευσης. Και στις δύο περιπτώσεις διερευνήθηκε η επίδραση: i) της αραίωσης του κασικίσιου γάλακτος και ii) της θερμικής κατεργασίας του κασικίσιου καθώς και του αγελαδινού γάλακτος τόσο στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία ανίχνευσης.

7.3.1 Ανάπτυξη ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο ή πρόβειο γάλα

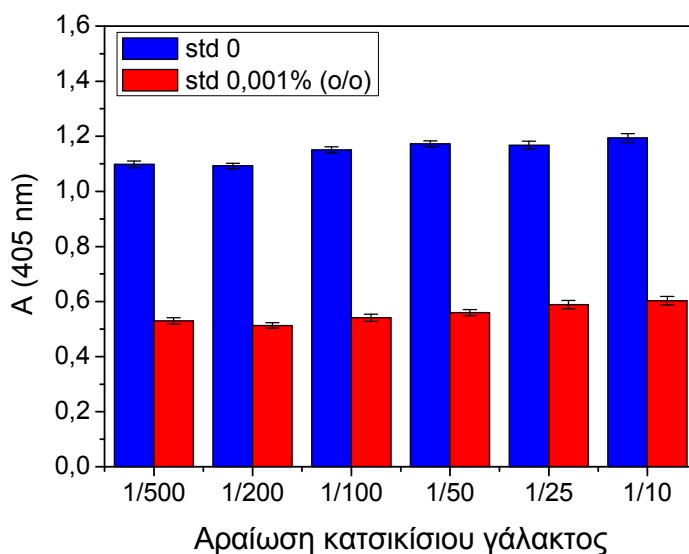
Ο ανοσοενζυμικός προσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο ή πρόβειο γάλα βασίστηκε στο πρωτόκολλο για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό κ-καζεΐνης σε φρεάτια μικροπιτλοδότησης. Συνοπτικά, για την επικάλυψη των φρεατίων μικροπιτλοδότησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 1 μg/mL σε συνδυασμό με το μονοκλωνικό αντίσωμα 33-4G10 σε συγκέντρωση 100 ng/mL, ενώ ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,9% (β/ο) NaCl, 0,05% (ο/ο) Tween 20 και 1% (β/ο) BSA. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο (ή πρόβειο) γάλα. Για την ανάλυση, εφαρμόστηκε προεπάση των προτύπων (μετά από κατάλληλη αραίωση με διάλυμα ανοσοαντίδρασης) με το διάλυμα του μονοκλωνικού αντισώματος σε αναλογία όγκου 1:1 για 60 min. Ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης ήταν 60 min, ενώ ο χρόνος επάσης του δευτέρου αντισώματος με το συζευγμένο στην ακινητοποιημένη κ-καζεΐνη μονοκλωνικό αντίσωμα ήταν 45 min.

7.3.1.1 Επίδραση της αραίωσης του κατσικίσιου γάλακτος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου

Προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της αραίωσης του κατσικίσιου γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης ελέγχθηκαν αραιώσεις κατσικίσιου γάλακτος που κυμαίνονταν από 1/10 έως 1/200. Στο σχήμα 34 παρουσιάζεται το αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και διαλύματα τα οποία περιείχαν φρέσκο αγελαδινό γάλα σε κατσικίσιο σε συγκεντρώσεις τέτοιες ώστε μετά την αραίωση η περιεκτικότητα να είναι 0,001% (ο/ο).

Όπως φαίνεται από το σχήμα, το αναλυτικό σήμα που ελήφθη τόσο για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα όσο και για τα πρότυπα διαλύματα που περιείχαν μετά από αραίωση 0,001% (ο/ο) φρέσκο αγελαδινό γάλα δεν επηρεαζόταν από την αραίωση του γάλακτος και παρέμενε ακριβώς το ίδιο για αραίωση από 10 έως και 200 φορές με το διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Ωστόσο, για την περαιτέρω μελέτη υιοθετήθηκε αραίωση των προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο 50 φορές, ώστε το δυναμικό εύρος της πρότυπης καμπύλης να

περιλαμβάνει τα όρια συγκεντρώσεων, πάνω από τα οποία η προσθήκη αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο θεωρείται νοθεία.



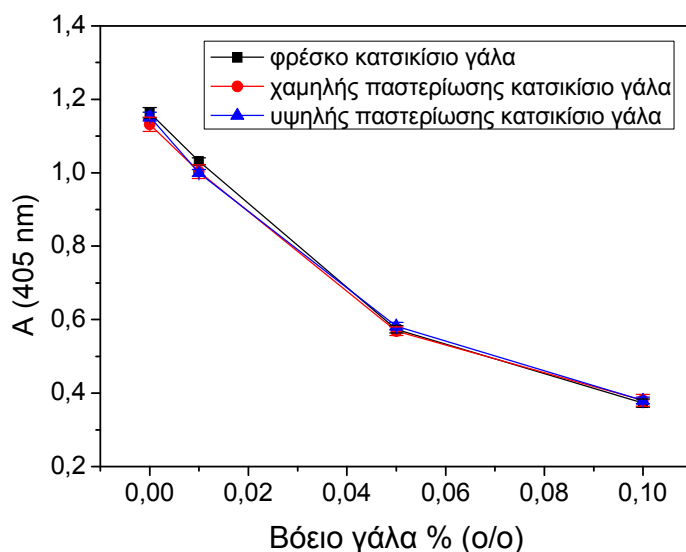
Σχήμα 34: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) για μηδενικό πρότυπο διάλυμα (μπλε στήλες) και για πρότυπο διάλυμα που περιείχε μετά από κάθε αραίωση 0,001% (o/o) φρέσκο αγελαδινό γάλα σε κασικίσιο γάλα (κόκκινες στήλες) για τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

7.3.1.2 Επίδραση της θερμικής κατεργασίας του κασικίσου και του αγελαδινού γάλακτος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου

Για να διαπιστωθεί η δυνατότητα της μεθόδου για ανίχνευση πέραν του φρέσκου και θερμικώς κατεργασμένου αγελαδινού γάλακτος τόσο σε φρέσκο όσο και σε θερμικά κατεργασμένο κασικίσιο γάλα, ελέγχθηκε αρχικά η επίδραση της θερμικής κατεργασίας του κασικίσου γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα φρέσκου αγελαδινού γάλακτος περιεκτικότητας 0,01, 0,05 και 0,1% σε: φρέσκο κασικίσιο γάλα, εμπορικά διαθέσιμο χαμηλής παστερίωσης κασικίσιο γάλα και σε εμπορικά διαθέσιμο υψηλής παστερίωσης κασικίσιο γάλα (Σχήμα 35).

Όπως διαπιστώνεται από το σχήμα 35, το λαμβανόμενο σήμα τόσο για το μηδενικό όσο και τα υπόλοιπα πρότυπα διαλύματα ταυίζονταν ανεξαρτήτως αν

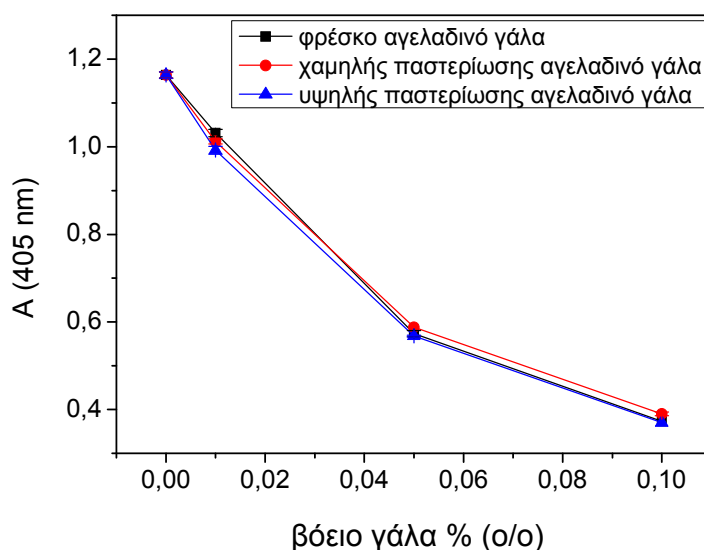
είχε χρησιμοποιηθεί ως μήτρα για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων φρέσκο ή θερμικά επεξεργασμένο κατσικίσιο γάλα.



Σχήμα 35: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο και για πρότυπα διαλύματα φρέσκου αγελαδινού γάλακτος περιεκτικότητας 0,01, 0,05 και 0,1% που παρασκευάστηκαν σε: φρέσκο (■), εμπορικά διαθέσιμο χαμηλής παστερίωσης (●) ή σε εμπορικά διαθέσιμο υψηλής παστερίωσης κατσικίσιο γάλα (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της θερμικής κατεργασίας του αγελαδινού γάλακτος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα ίδιας περιεκτικότητας σε αγελαδινό γάλα με χρήση φρέσκου, εμπορικά διαθέσιμου χαμηλής παστερίωσης και εμπορικά διαθέσιμου υψηλής παστερίωσης αγελαδινού γάλακτος σε φρέσκο κατσικίσιο γάλα (Σχήμα 36).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 36, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης που ελήφθησαν όταν για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε φρέσκο ή θερμικά κατεργασμένο αγελαδινό γάλα.



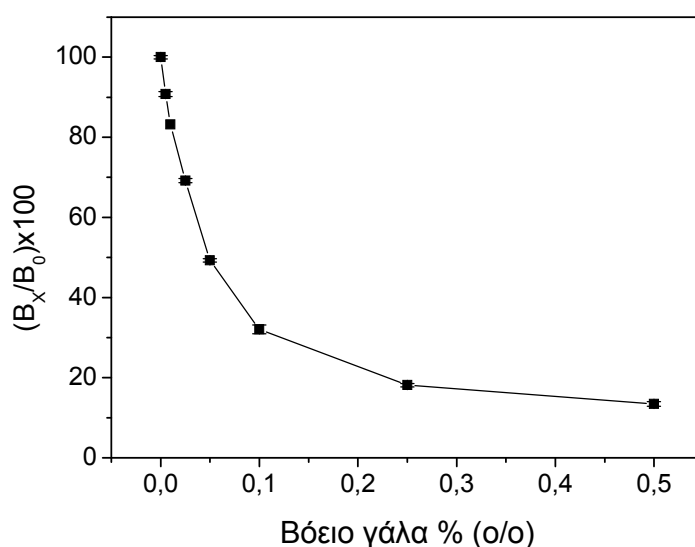
Σχήμα 36: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο καθώς και για τα πρότυπα διαλύματα φρέσκου αγελαδινού γάλακτος (■), χαμηλής παστερίωσης εμπορικά διαθέσιμου αγελαδινού γάλακτος (●) και υψηλής παστερίωσης εμπορικά διαθέσιμου αγελαδινού γάλακτος (▲), περιεκτικότητας 0,01, 0,05 και 0,1% (o/o) σε φρέσκο κατσικίσιο γάλα για τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό.

Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

7.3.1.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν κατά την βελτιστοποίηση του ανταγωνιστικού ανοσοενζυμικού προσδιορισμού του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα (εδάφιο 7.3.1), καταρτίστηκε το τελικό πρωτόκολλο του, το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 6.4.2. Μια τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού παρουσιάζεται στο σχήμα 37.

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο, τα οποία προσδιορίστηκαν όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 7.1.7 και αφορούν αραιώση του δείγματος κατσικίσιου γάλακτος 50 φορές.



Σχήμα 37: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο του ανοσοεζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Πίνακας 13: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοεζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο.

	αγελαδινό γάλα% (o/o)
LOD (% o/o)	0,0013
LOQ (% o/o)	0,0027
IC50 (% o/o)	0,049
Δυναμικό εύρος (% o/o)	0,0050-0,5
Ενδο-αναλυτικό CV (%)	0,80-1,9
Διαναλυτικό CV (%)	1,1-2,1

Αξίζει να σημειωθεί, ότι επιλέγοντας μεγαλύτερη αραιώση είναι δυνατόν να καθοριστεί μια δυναμική περιοχή που να επιτρέπει τον προσδιορισμό ποσοστών νοθείας με αγελαδινό γάλα μεγαλύτερο του 0,5% (o/o). Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο γάλα και βρέθηκε ότι η καμπύλη βαθμονόμησης και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά που ελήφθησαν ήταν ίδια με εκείνα που ελήφθησαν για το κατσικίσιο γάλα.

7.3.2 Ανάπτυξη ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκε πέραν του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου και ανοσοενζυμικός προσδιορισμός μη ανταγωνιστικού τύπου, προκειμένου να επιλεγεί ο βέλτιστος για μεταφορά στον οπτικό αισθητήρα. Για την ανάπτυξη του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου έπρεπε αρχικά να επιλεγούν το ειδικό αντίσωμα έναντι της βοείου κ-καζεΐνης που θα χρησιμοποιηθεί για επικάλυψη των φρεατίων μικροπιλοδότησης καθώς και η βέλτιστη συγκέντρωσή του ειδικού αντισώματος που θα χρησιμοποιηθεί ως αντίσωμα ανίχνευσης. Για τον σκοπό, τα δύο μονοκλωνικά αντισώματα κατά της κ-καζεΐνης βιοτινυλώθηκαν προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως αντισώματα ανίχνευσης σε συνδυασμό με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με HRP. Επίσης, μελετήθηκε εκ νέου η σύσταση του διαλύματος ανοσοαντίδρασης με στόχο την αύξηση του αναλυτικού σήματος και τη μείωση του σήματος μη ειδικής δέσμευσης, ενώ υιοθετήθηκαν τα διαλύματα: ακινητοποίησης, αποκλεισμού των ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων καθώς και έκπλυσης που είχαν επιλεγεί κατά την ανάπτυξη του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου της βοείου κ-καζεΐνης. Άλλες παράμετροι που ελέγχθηκαν ήταν η βέλτιστη αραίωση του κατσικίσιου γάλακτος καθώς και η επίδραση της θερμικής κατεργασίας του αγελαδινού γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης.

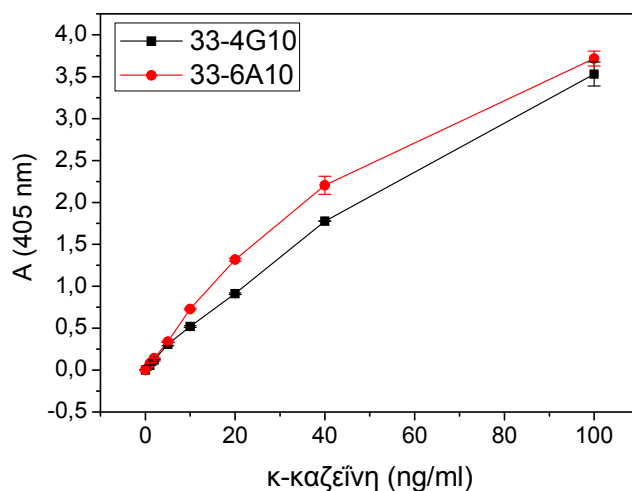
Για την επιλογή του βέλτιστου συνδυασμού και συγκέντρωσης ειδικών αντισωμάτων για την επικάλυψη των φρεατίων και την ανοσοαντίδραση, τη σύσταση του διαλύματος ανοσοαντίδρασης και την αραίωση του κατσικίσιου γάλακτος ως πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα κ-καζεΐνης σε κατσικίσιο γάλα.

7.3.2.1 Επιλογή του αντισώματος για την επικάλυψη των φρεατίων μικροπιλοδότησης και της βέλτιστης συγκέντρωσής του

Για την ανάπτυξη του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου ελέγχθηκε τόσο ο συνδυασμός του ειδικού αντισώματος έναντι της βοείου κ-καζεΐνης 33-6A10 (σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) για την επικάλυψη των φρεατίων και του ειδικού αντισώματος 33-4G10 (σε συγκέντρωση 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ως αντίσωμα δέσμευσης όσο και ο αντίστροφος συνδυασμός. Η επιλογή του βέλτιστου

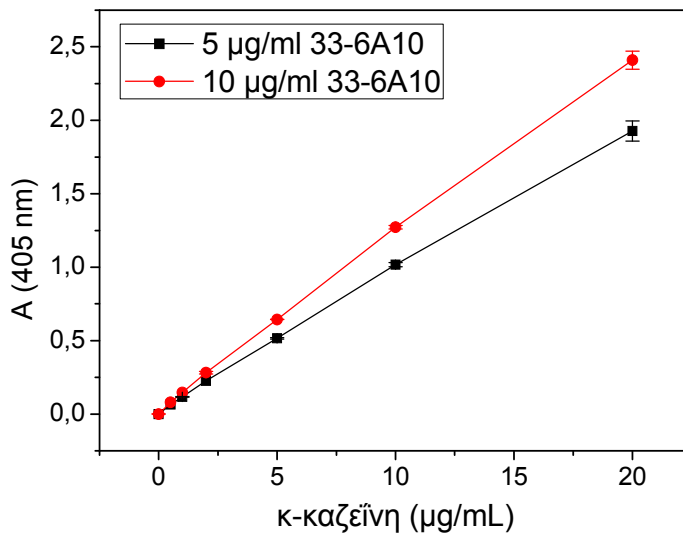
συνδυασμού πραγματοποιήθηκε με κριτήριο την επάρκεια του αναλυτικού σήματος, την ευαισθησία ανίχνευσης της καμπύλης βαθμονόμησης και το αναλυτικό σήμα μη ειδικής δέσμευσης (Σχήμα 38).

Όπως προκύπτει από το σχήμα, το υψηλότερο αναλυτικό σήμα για όλη την περιοχή της καμπύλης ελήφθη όταν χρησιμοποιήθηκε ως αντίσωμα για την επικάλυψη των φρεατίων το 33-6A10 και ως αντίσωμα δέσμευσης το 33-4G10. Επιπλέον, με το συγκεκριμένο συνδυασμό το σήμα μη ειδικής δέσμευσης ήταν κατά 20% χαμηλότερο σε σχέση με εκείνο που ελήφθη με τον δεύτερο συνδυασμό. Ως εκ τούτου, υιοθετήθηκε για τα περαιτέρω πειράματα το 33-6A10 ως αντίσωμα για την επικάλυψη των φρεατίων και το 33-4G10 ως αντίσωμα δέσμευσης.



Σχήμα 38: Καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου και πρότυπα διαλύματα κ- καζεΐνης σε κατσικίσιο γάλα όταν: ως αντίσωμα για την επικάλυψη των φρεατίων χρησιμοποιήθηκε το 33- 4G10 και ως αντίσωμα δέσμευσης το 33-6A10 (■) ή αντιστρόφως (●). Σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση των αντισωμάτων ήταν 5 mg/mL. Από τις τιμές οπτικής απορρόφησης έχει αφαιρεθεί το σήμα του μηδενικού προτύπου (σήμα μη ειδικής δέσμευσης). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Η επόμενη παράμετρος η οποία μελετήθηκε ήταν η συγκέντρωση του αντισώματος 33-6A10 για την επικάλυψη των φρεατίων μικροπιλοδότησης. Για το σκοπό αυτό, ελήφθησαν πρότυπες καμπύλες με φρεάτια που είχαν επικαλυφθεί με διαλύματα του αντισώματος 33-6A10 συγκέντρωσης 5 μ g/mL και 10 μ g/mL (Σχήμα 39). Η συγκέντρωση του αντισώματος δέσμευσης ήταν και στις δύο συγκεντρώσεις 5 μ g/mL.



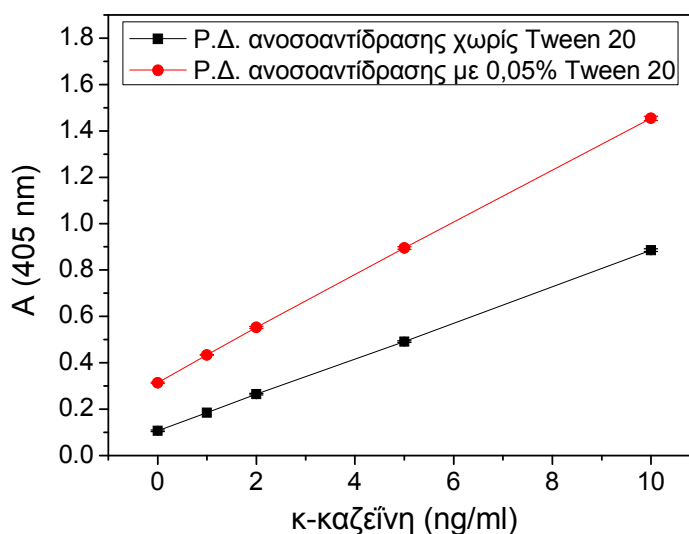
Σχήμα 39: Καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου για πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης που είχαν παρασκευαστεί σε κατσικίσιο γάλα όταν η συγκέντρωση του αντισώματος 33-6A10 στο διάλυμα ακινητοποίησης ήταν 5 μg/mL (■) και 10 μg/mL (●), αντίστοιχα. Από τις τιμές οπτικής απορρόφησης έχει αφαιρεθεί το σήμα του μηδενικού προτύπου (σήμα μη ειδικής δέσμησης). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 39, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του αναλυτικού σήματος όταν η συγκέντρωση του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε για την επικάλυψη των φρεατίων μικροτιλοδότησης αυξήθηκε από 5 σε 10 μg/mL, ενώ το σήμα μη ειδικής δέσμησης παρέμεινε αμετάβλητο. Για το λόγο αυτό, στα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκε το 33-6A10 σε συγκέντρωση 10 μg/mL για την επικάλυψη των φρεατίων μικροτιλοδότησης.

7.3.2.2 Επίδραση του Tween 20 στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα

Στα πλαίσια της ανάπτυξης του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο ελέγχθηκε η επίδραση της παρουσίας του επιφανειοδραστικού Tween 20 στο διάλυμα ανοσοαντίδρασης τόσο στο ειδικό όσο και στο σήμα μη ειδικής δέσμησης. Στο σχήμα 40 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο και πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκεντρώσεως 1, 2, 5, και

10 ng/mL με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης που δεν περιείχε Tween 20 ή περιείχε 0,05% (ο/ο) Tween 20.



Σχήμα 40: Καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου για πρότυπα διαλύματα κ- καζεΐνης σε κατσικίσιο γάλα όταν το διάλυμα ανοσοαντίδρασης δεν περιείχε Tween 20 (■) ή περιείχε 0,05% (ο/ο) Tween 20 (●).

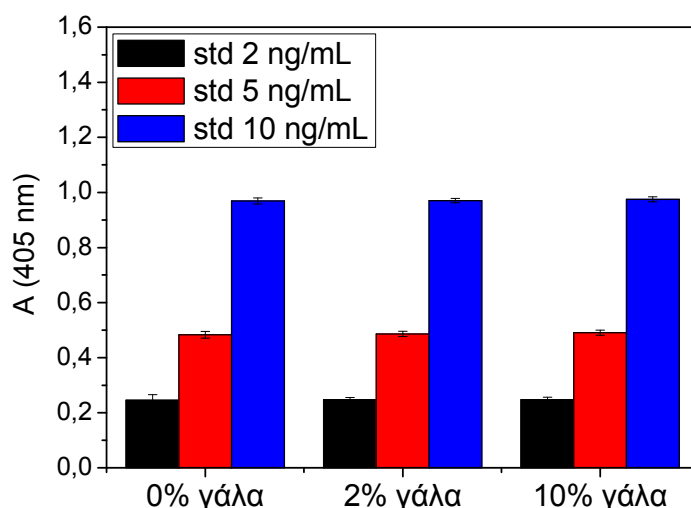
Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως προκύπτει από το σχήμα 40, το σήμα μη ειδικής δέσμευσης (μηδενικό πρότυπο διάλυμα) μειώθηκε κατά 66% (με τιμή οπτικής απορρόφησης ίση με 0,1065) όταν το διάλυμα ανοσοαντίδρασης δεν περιείχε Tween 20 σε σχέση με το σήμα μη ειδικής δέσμευσης που ελήφθη όταν το διάλυμα ανοσοαντίδρασης δεν περιείχε Tween 20. Ως εκ τούτου, στο τελικό πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο υιοθετήθηκε το ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 0,9% (β/ο) NaCl και 1% (β/ο) BSA.

7.3.2.3 Επίδραση της αραίωσης του κατσικίσιου γάλακτος στον μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό σε φρεάτια μικροτιλοδότησης

Όπως και στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου, ελέγχθηκε η επίδραση της αραίωσης του κατσικίσιου γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν

πρότυπα διαλύματα κ-καζεΐνης συγκέντρωσης 2, 5 και 10 ng/mL σε: i) ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης που δεν περιείχε κατσικίσιο γάλα, ii) ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης που περιείχε 2%(ο/ο) κατσικίσιο γάλα (αραίωση γάλακτος 50 φορές) ή iii) ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης που περιείχε 10% κατσικίσιο γάλα (αραίωση γάλακτος 10 φορές) (Σχήμα 43).



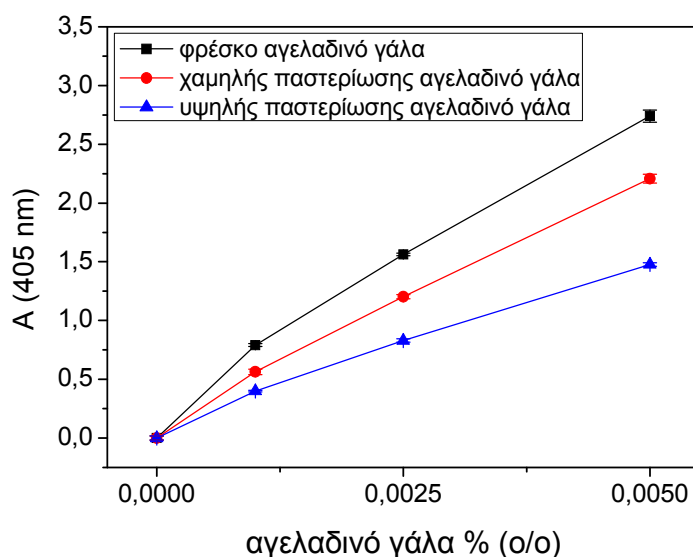
Σχήμα 41: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που ελήφθησαν με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου για πρότυπα καζεΐνης συγκέντρωσης 2 (μαύρες στήλες), 5 ng/mL (κόκκινες στήλες) και 10 ng/mL (μπλε στήλες) τα οποία είχαν παρασκευαστεί σε : i) ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης, ii) ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης που περιείχε 2% κατσικίσιο γάλα, ή iii) ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης που περιείχε 10% κατσικίσιο γάλα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στο σχήμα 41, δεν υπήρχε διαφορά στα σήματα που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα ίδιας συγκέντρωσης που είχαν παρασκευαστεί σε διαλύματα με διαφορετική περιεκτικότητα σε κατσικίσιο, τα οποία αντιστοιχούσαν σε αραίωση του κατσικίσιου γάλακτος 10 και 50 φορές. Ως εκ τούτου και προκειμένου να ληφθεί η καμπύλη βαθμονόμησης με την μεγαλύτερη δυνατή ευαισθησία ανίχνευσης, επιλέχθηκε αραίωση του κατσικίσιου γάλακτος 10 φορές για το τελικό πρωτόκολλο προσδιορισμού του αγελαδινού γάλακτος.

7.3.2.4 Επίδραση της θερμικής κατεργασίας του κασικίσιου και του αγελαδινού γάλακτος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου

Για την ανίχνευση θερμικώς κατεργασμένου αγελαδινού γάλακτος με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου μελετήθηκε αρχικά η επίδραση θερμικής κατεργασίας του κασικίσιου γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Όπως βρέθηκε και στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στο αναλυτικό σήμα που ελήφθη τόσο για το μηδενικό πρότυπο όσο και για το πρότυπο διάλυμα που περιείχε 0,001% αγελαδινό γάλα (o/o) όταν το κασικίσιο γάλα που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την παρασκευή των προτύπων ήταν φρέσκο, χαμηλής παστερίωσης ή υψηλής παστερίωσης.

Έτσι προκείμενου να διερευνηθεί η επίδραση της θερμικής κατεργασίας του αγελαδινού γάλακτος στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε φρέσκο κασικίσιο γάλα τα οποία περιείχαν 0,001%, 0,0025% και 0,005% (o/o) φρέσκο αγελαδινό γάλα, χαμηλής παστερίωσης εμπορικά διαθέσιμο αγελαδινό γάλα ή υψηλής παστερίωσης εμπορικά διαθέσιμο αγελαδινό γάλα (Σχήμα 42).

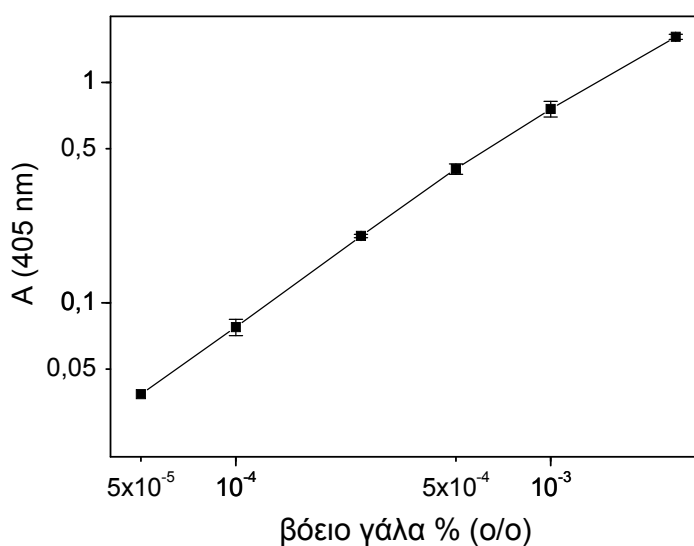


Σχήμα 42: Τιμές οπτικής απορρόφησης (405 nm) που λαμβάνονται για το μηδενικό πρότυπο και για τα πρότυπα διαλύματα περιεκτικότητας 0,001, 0,0025 και 0,005% (o/o) σε φρέσκο αγελαδινό γάλα (■), εμπορικά διαθέσιμο αγελαδινό γάλα χαμηλής παστερίωσης (●) και εμπορικά διαθέσιμο αγελαδινό υψηλής παστερίωσης (▲), σε φρέσκο κασικίσιο γάλα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως διαπιστώνεται από το σχήμα 42, η θερμική κατεργασία του αγελαδινού γάλακτος επιδρά αρνητικά στο αναλυτικό σήμα που λαμβάνεται για τα πρότυπα διαλύματα. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πτώση του σήματος σε σχέση με το φρέσκο γάλα που κυμαινόταν από 20 έως 28% όταν το αγελαδινό γάλα που χρησιμοποιήθηκε ήταν χαμηλής παστερίωσης και από 46 έως 50% όταν το αγελαδινό γάλα ήταν υψηλής παστερίωσης.

7.3.2.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα

Μετά την βελτιστοποίηση των διαφόρων παραμέτρων του ανοσοπροσδιορισμού, καταρτίστηκε το τελικό πρωτόκολλο του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα, το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 6.4.2. Ακολουθώντας αυτό το πρωτόκολλο, ελήφθη η καμπύλη βαθμονόμησης του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα που παρουσιάζεται στο Σχήμα 43.



Σχήμα 43: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο, τα οποία προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στο εδάφιο 7.1.7.

Πίνακας 14: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοενζυμικού προσδιορισμού μη ανταγωνιστικού τύπου του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο

	αγελαδινό γάλα% (ο/ο)
LOD (% ο/ο)	$2,5 \times 10^{-5}$
LOQ (% ο/ο)	$5,0 \times 10^{-5}$
Δυναμικό εύρος (% ο/ο)	$5,0 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-3}$
Ενδο-αναλυτικό SD	1,56-6,50
Δι-αναλυτικό SD	2,55-7,56

7.3.2.6 Σύγκριση αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με τον ανταγωνιστικού και τον μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα, σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης

Από την σύγκριση των δύο μεθόδων προκύπτει ότι, το όριο ανίχνευσης που ελήφθη με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου ήταν περίπου εκατό φορές χαμηλότερο απ' ό,τι εκείνο που ελήφθη με τον ανταγωνιστικού τύπου προσδιορισμό. Ωστόσο, για τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των καμπυλών βαθμονόμησης που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας φρέσκο, χαμηλής παστερίωσης και υψηλής παστερίωσης αγελαδινό γάλα κάτι που δεν ισχύει για τον ανοσοπροσδιορισμό μη ανταγωνιστικού τύπου. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών, επιλέχθηκε το πρωτόκολλο του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού τύπου για μεταφορά στον οπτικό ανοσοαισθητήρα.

7.4 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου ανοσοχημικού προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο ή πρόβειο γάλα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα

Για τη μεταφορά στον οπτικό ανοσοαισθητήρα της ανοσοενζυμικής μεθόδου ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο ή πρόβειο, επτά από τα 10 MZIs της ψηφίδας τροποποιήθηκαν με κ-καζεΐνη (100 μg/mL), ενώ τα υπόλοιπα τρία με BSA (100 μg/mL) προκειμένου να προσδιοριστεί το σήμα μη ειδικής δέσμησης (εδάφιο 6.10). Επιπλέον, για την ανοσοαντίδραση χρησιμοποιήθηκε μίγμα των μονοκλωνικών αντισωμάτων 33-4G10 και 33-6A10 σε κατά βάρος αναλογία 1:1 και τελική συγκέντρωση 0,5 μg/mL. Ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης

χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4, που περιείχε 1% BSA (β/ο). Στα πλαίσια της ανάπτυξης του ανοσοχημικού προσδιορισμού του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο ή πρόβειο γάλα με τον ανοσοαισθητήρα της παρούσας διατριβής βελτιστοποιήθηκε εκ νέου το διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης στην επιφάνεια της ψηφίδας, η μήτρα για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων και η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης.

7.4.1 Επιλογή του βέλτιστου διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων και μήτρας παρασκευής των προτύπων διαλυμάτων

Λόγω της πολυπλοκότητας της μήτρας του γάλακτος, κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί η επίδραση της σύστασης του διαλύματος αποκλεισμού τόσο στο ειδικό όσο και στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα για την κάλυψη ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας: Α) ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών 0,1 M, pH 8,5, 1% (β/ο) BSA, Β) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 μM, pH 7,4, 0,5% (β/ο) ζελατίνη, και Γ) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 με 1% (ο/ο) φρέσκο κατσικίσιο γάλα.

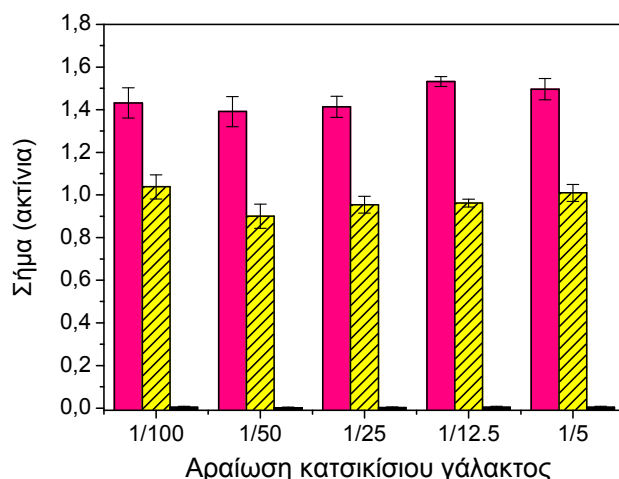
Βρέθηκε ότι με τα διαλύματα αποκλεισμού Α και Γ τα σήματα που ελήφθησαν και οι τιμές μη ειδικής δέσμευσης ήταν παρεμφερείς ενώ με το διάλυμα Β παρατηρήθηκε μικρή πτώση του σήματος. Για τη μελέτη επιλέχθηκε το διάλυμα Γ λόγω του ότι παρείχε ταχύτερη εξισορρόπηση του αισθητήρα μετά την αναγέννηση (2-3 min) σε σχέση με το διάλυμα Α με το οποίο η εξισορρόπηση επιτυγχάνονταν σε χρόνο μεγαλύτερο των 10 min.

Προκειμένου να επιλεγεί η μήτρα παρασκευής των προτύπων διαλυμάτων όσον αφορά την ανίχνευση αγελαδινού σε κατσικίσιο γάλα, δοκιμάστηκαν διαφορετικά δείγματα φρέσκου κατσικίσιου γάλακτος (N=12) που προέρχονταν από διαφορετικές φάρμες της Αττικής, καθώς επίσης και εμπορικά διαθέσιμο παστεριωμένο (N=1) και υψηλής παστερίωσης κατσικίσιο γάλα (N=2). Τα διαφορετικού τύπου και προέλευσης γάλατα συγκρίθηκαν ως προς το σήμα του μηδενικού προτύπου. Βρέθηκε ότι για όλα τα γάλατα που δοκιμάστηκαν το αναλυτικό σήμα για το μηδενικό πρότυπο είχε παρεμφερείς τιμές (N=15, CV=3,2). Ωστόσο, λόγω της εποχιακής διαθεσιμότητας του εμπορικά διαθέσιμου παστεριωμένου κατσικίσιου γάλακτος (κυρίως για την περίοδο Σεπτέμβριος-Μάρτιος), επιλέχθηκε το φρέσκο κατσικίσιο γάλα για την παρασκευή των

προτύπων διαλυμάτων, το οποίο μετά την συλλογή του, κατανεμήθηκε σε μικρότερες ποσότητες και φυλάχθηκε στους -20°C ώστε να είναι διαθέσιμο ανά πάσα στιγμή. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του πρόβειου γάλακτος ήταν διαθέσιμο μόνο φρέσκο γάλα για την παρασκευή των προτύπων.

7.4.3 Μελέτη της επίδρασης της μήτρας του δείγματος

Το γάλα είναι ένα πολύπλοκο βιολογικό δείγμα λευκού ή υποκίτρινου χρώματος λόγω των αιωρούμενων σωματιδίων (λιπιδίων, πρωτεϊνών και ιχνοστοιχείων). Επομένως, η παρουσία του μπορεί να επηρεάσει την απόκριση του αισθητήρα, δεδομένου ότι η μέτρηση βασίζεται στην αλληλεπίδραση του φθίνοντος κύματος με το δείγμα στη εγγύτητα της επιφάνειας του κυματοδηγού. Επιπλέον, τα συστατικά του γάλακτος μπορεί να επηρεάσουν την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος και κατά συνέπεια τον προσδιορισμό με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Για να διαπιστωθεί η επίδραση του κασικίσιου γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης, ελέγχθηκαν αραιώσεις κασικίσιου γάλακτος που κυμαίνονταν από 1/5 έως 1/100. Στο σχήμα 44 παρουσιάζεται το αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και τα πρότυπα διαλύματα τα οποία είχαν παρασκευαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να περιέχουν 0,005% (ο/ο) αγελαδινό γάλα σε κασικίσιο μετά από την εκάστοτε αραιώση, καθώς επίσης και το σήμα μη ειδικής δέσμευσης.

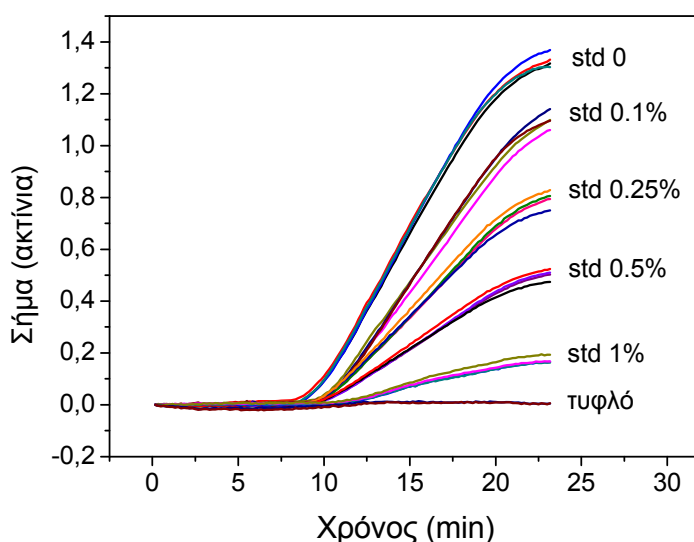


Σχήμα 44: Τιμές αναλυτικού σήματος (ακτίνια) που ελήφθησαν για μηδενικό πρότυπο διάλυμα (ροζ στήλες) ή διάλυμα που περιείχε 0,005% (ο/ο) αγελαδινό γάλα σε κασικίσιο γάλα μετά την αραιώση (κίτρινες στήλες), καθώς και οι αντίστοιχες τιμές του σήματος μη ειδικής δέσμευσης (μαύρες στήλες). Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή 7 επαναληπτικών μετρήσεων $\pm\text{SD}$ για την περίπτωση του ειδικού σήματος, ενώ για την περίπτωση του μη ειδικού σήματος τη μέση τιμή 3 μετρήσεων $\pm\text{SD}$.

Όπως προκύπτει από στο σχήμα 44, το αναλυτικό σήμα που ελήφθη για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα και για τα πρότυπα διαλύματα που περιείχαν συγκεκριμένη ποσότητα αγελαδινού γάλακτος ήταν σταθερό και ανεξάρτητο της αραιώσης του κασικίσιου γάλακτος. Επιπλέον, για όλες τις αραιώσεις του κασικίσιου γάλακτος, το σήμα της μη ειδικής δέσμευσης ήταν παρεμφερές ($\leq 0,005$ ακτίνια). Επομένως, η παρουσία του κασικίσιου γάλακτος στις αραιώσεις που ελέγχθηκαν δεν επηρεάζει την ανοσοαντίδραση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές αραιώσεις προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα του κασικίσιου γάλακτος σε αγελαδινό κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων. Εν τούτοις, επιλέχθηκε αραιώση των προτύπων αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο 50 φορές ώστε δυναμικό εύρος της καμπύλης να καλύπτει περιεκτικότητες σε αγελαδινό 0-1% (o/o). Ανάλογα αποτελέσματα ελήφθησαν και με πρόβειο γάλα, οπότε και στην περίπτωση αυτή επιλέχθηκε αραιώση 50 φορές των προτύπων για την διεξαγωγή της ανάλυσης.

7.4.4 Χρονική μελέτη της ανοσοαντίδρασης

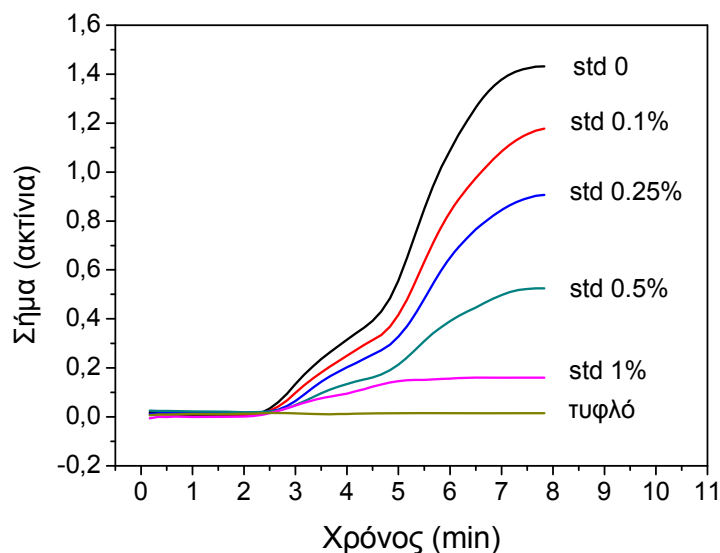
Στο σχήμα 45 παρουσιάζονται οι αποκρίσεις που ελήφθησαν τόσο για το μηδενικό πρότυπο όσο και για πρότυπα διαλύματα αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο με περιεκτικότητα από 0,1 έως 1% (o/o).



Σχήμα 45: Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από 4 MZIs μιας ψηφίδας κατά τη διαβίβαση μιγμάτων των αντισωμάτων κατά της κ-καζείνης με πρότυπα διαλύματα αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο γάλα περιεκτικότητας 0-1% (o/o) αποκρίσεις από 2 MZIs που αντιστοιχούν στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης (τυφλό).

Όλα τα πρότυπα είχαν αραιωθεί 50 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοανάλυσης και επωαστεί με μίγμα αντισωμάτων συγκέντρωσης 0,5 µg/mL για 10 min, πριν την διαβίβασή τους από την επιφάνεια της βιοενεργοποιημένης με κ-καζεΐνη ψηφίδας με σταθερή ταχύτητα 50 µL/min. Όπως προκύπτει από το σχήμα μέγιστες τιμές οροφής προκύπτουν για χρόνους αντίδρασης ≥ 10 min.

Προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης καθώς και η κατανάλωση των ειδικών αντισωμάτων, διερευνήθηκε, όπως και στο εδάφιο 7.2.5, η εισαγωγή ενός σταδίου ενίσχυσης σήματος μετά την ανοσοαντίδραση με χρήση αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού (δεύτερο αντίσωμα). Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε εισαγωγέας δείγματος συνδεδεμένος με βρόχο 100 µL ώστε ο όγκος των αντιδραστηρίων που διαβιβάζονται πάνω από την ψηφίδα να είναι σταθερός. Εφαρμόζοντας ταχύτητα ροής 35 µL/min, τα μίγματα των προτύπων διαλυμάτων αγελαδινού γάλακτος με τα ειδικά αντισώματα έναντι της κ-καζεΐνης διαβιβάστηκαν επί 2,5 min και ακολούθησε διαβίβαση του διαλύματος του δευτέρου αντισώματος επί 2,5 min. Στο σχήμα 46, παρουσιάζονται οι αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο για το μηδενικό πρότυπο και για τα πρότυπα διαλύματα με περιεκτικότητα από 0,1 έως 1,0% (ο/ο) σε αγελαδινό γάλα.

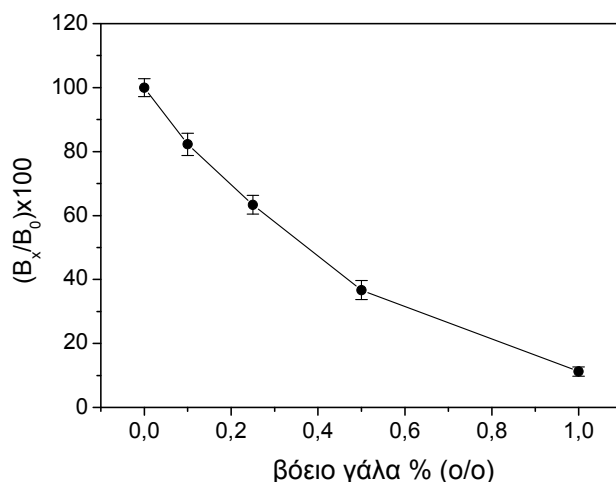


Σχήμα 46: Αποκρίσεις που ελήφθησαν σε πραγματικό χρόνο από 4 MZIs μιας ψηφίδας κατά τη διαβίβαση μιγμάτων των αντισωμάτων κατά της κ-καζεΐνης με πρότυπα διαλύματα αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα περιεκτικότητας 0- 1% (ο/ο) επί 2,5 min ακολουθούμενη από διέλευση διαλύματος 2^{ου} αντισώματος επί 2,5 min και αποκρίσεις 2 MZIs που αντιστοιχούν στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης (τυφλό).

Όπως διαπιστώνεται από τη σύγκριση των αποκρίσεων που παρουσιάζονται στα σχήματα 45 και 46, η χρήση του δεύτερου αντισώματος είχε ως αποτέλεσμα 10% υψηλότερο σήμα χωρίς να επηρεάζεται η ευαισθησία και το δυναμικό εύρος της καμπύλης βαθμονόμησης, ενώ παράλληλα ο χρόνος της συνολικής ανάλυσης μειώθηκε στο μισό (από 10 σε 5 min). Για τον λόγο αυτό αποφασίστηκε, η υιοθέτηση του σχήματος ανάλυσης με χρήση δευτέρου αντισώματος ως μέσου ενίσχυσης του σήματος που λαμβάνεται κατά την αντίδραση της κ-καζεΐνης με τα ειδικά αντισώματα.

7.4.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοχημικού προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα

Εφαρμόζοντας το τελικό πρωτόκολλο ανοσοχημικού προσδιορισμού του αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο, το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 6.9, ελήφθη η καμπύλη βαθμονόμησης που παρουσιάζεται στο σχήμα 47. Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανοσοπροσδιορισμού αναγράφονται στον πίνακα 15.



Σχήμα 47: Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα που ελήφθη με το τελικό πρωτόκολλο ανοσοχημικού προσδιορισμού με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 7 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Για τον προσδιορισμό των συντελεστών διακύμανσης της μέσης τιμής των μετρήσεων (CV%) παρασκευάστηκαν τρία δείγματα ελέγχου με προσθήκη 0,15, 0,3 και 0,75% αγελαδινού γάλακτος σε φρέσκο κατσικίσιο γάλα. Η ένδο-αναλυτική επαναληψιμότητα υπολογίστηκε από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των τριών δειγμάτων ελέγχου με τέσσερις διαφορετικές ψηφίδες μέσα στην ίδια μέρα,

ενώ η δια-ναλυτική επαναληψιμότητα υπολογίστηκε από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των τριών δειγμάτων ελέγχου με δύο ψηφίδες πυριτίου ανά ημέρα, σε οχτώ διαφορετικές ημέρες και σε διάστημα ενός μήνα.

Πίνακας 15: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανασοχημικού προσδιορισμού αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.

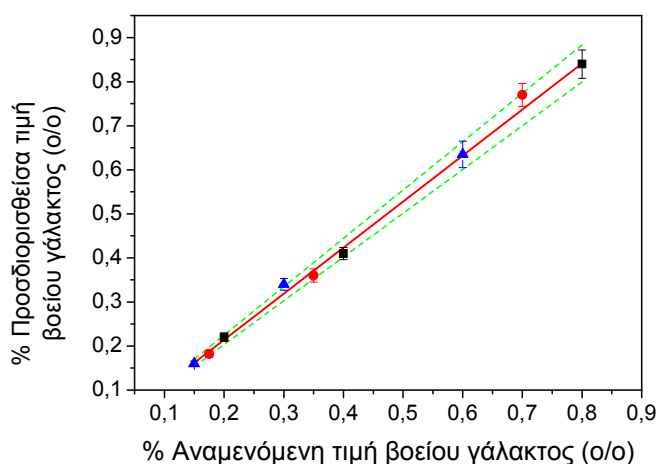
	αγελαδινό γάλα (%)
LOD	0,048
LOQ	0,095
IC50	0,37
Δυναμικό εύρος	0,1-1
Ενδο-αναλυτικό CV	2,4-3,7
Διαναλυτικό CV	3,1-5,2

Για την αξιολόγηση της ακρίβειας της αναπτυχθείσας μεθόδου με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης, καθώς και γραμμικότητας αραιώσης δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Για την ανάκτηση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φρέσκου, παστεριωμένου και υψηλής παστερίωσης κασικίσιου γάλακτος (15 στο σύνολο) στα οποία προστέθηκε φρέσκο αγελαδινό γάλα σε συγκεντρώσεις (0,25, 0,5, 2 και 10% και αναλύθηκαν με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα τόσο πριν όσο και μετά την προσθήκη του αγελαδινού γάλακτος. Σε κανένα από τα δείγματα κασικίσιου γάλακτος δεν ανιχνεύτηκε αγελαδινό σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το όριο ανίχνευσης. Στον πίνακα 16 παρουσιάζεται η μέση τιμή της περιεκτικότητας που προσδιορίστηκε μετά την προσθήκη αγελαδινού γάλακτος. Η μέση τιμή προέκυψε από τις αποκρίσεις που ελήφθησαν από επτά MZIs τα οποία είχαν τροποποιηθεί με κ-καζεΐνη. Τα δείγματα των οποίων η περιεκτικότητά σε αγελαδινό ήταν >1% αραιώθηκαν κατάλληλα με διάλυμα ανοσοαντίδρασης έτσι ώστε να βρίσκονται εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης.

Πίνακας 16: Επί τοις εκατό ανάκτηση αγελαδινού γάλακτος μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων σε φρέσκο κατσικίσιο γάλα

Προσθεθείσα περιεκτικότητα αγελαδινού γάλακτος (%)	Προσδιορισθείσα περιεκτικότητα αγελαδινού γάλακτος (%)	Ανάκτηση (%)
0	<LOD	-
0,25	0,24±0,0085	96
0,75	0,78±0,027	104
2,0	2,2±0,11	110
10	9,3±0,36	93

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας αραιώσης παρασκευάστηκαν δείγματα με προσθήκη 0,8, 0,7 και 0,6% (ο/ο) αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο γάλα, τα οποία στη συνέχεια αραιώθηκαν διαδοχικά με διάλυμα ανοσοαντίδρασης έτσι ώστε οι περιεκτικότητες των αραιωμένων δειγμάτων να εμπίπτουν στην γραμμική περιοχή απόκρισης της καμπύλης βαθμονόμησης. Στο σχήμα 48 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος γραμμικότητας της αραιώσης ως συσχέτιση των αναμενόμενων και προσδιορισθέντων τιμών των αρχικών και των αραιωμένων δειγμάτων. Σύμφωνα με το σχήμα, η κλίση της ευθείας (α) είναι $1,045 \pm 0,016$, η τεταγμένη επί την αρχή (β) είναι $0,005 \pm 0,008$, και ο συντελεστής συσχέτισης της ευθείας παλινδρόμησης είναι 0,998.



Σχήμα 48: Συσχέτιση των αναμενόμενων με τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο που ελήφθησαν με διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων στα οποία η αρχική προσθήκη ήταν: 0,8% (ο/ο) (■), 0,7% (ο/ο) (●) και 0,6% (ο/ο) (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 7 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

7.4.6 Ανάλυση δειγμάτων πρόβειου γάλακτος ως προς την περιεκτικότητά τους σε αγελαδινό γάλα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα και σύγκριση με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροπιλοδότησης

Ο οπτικός αισθητήρας που αναπτύχθηκε αξιολογήθηκε επίσης ως προς την ικανότητα ανίχνευσης αγελαδινού γάλακτος σε πρόβειο γάλα μέσω της ανάλυσης δειγμάτων τα οποία παρασχέθηκαν από τη γαλακτοβιομηχανία ΔΕΛΤΑ και στα οποία είχαν προστεθεί ποσότητες αγελαδινού γάλακτος. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν επίσης με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τις δύο μεθόδους παρουσιάζονται στον πίνακα 17.

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 17, τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τα έξι δείγματα πρόβειου γάλακτος με τον αισθητήρα ήταν σε καλή συμφωνία με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Επιπλέον, η ανάκτηση που προσδιορίστηκε και για τις δύο μεθόδους κυμαινόταν από 90 έως 112%. Η ορθότητα των τιμών που προσδιορίστηκαν επιβεβαιώθηκε από τη γαλακτοβιομηχανία.

Πίνακας 17: % Περιεκτικότητα αγελαδινού γάλακτος σε δείγματα πρόβειου γάλακτος με τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό σε φρεάτια μικροπιλοδότησης και με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα.

Δείγμα	% Προσθήκη αγελαδινού	% (ο/ο) αγελαδινό γάλα \pm SD(%) n=7	
		ELISA	ΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ
A	2	1,9 \pm 0,060	2,2 \pm 0,090
B	1	0,91 \pm 0,017	1,1 \pm 0,055
Γ	0,5	0,48 \pm 0,0091	0,54 \pm 0,0021
Δ	0,4	0,41 \pm 0,0086	0,40 \pm 0,015
E	0,3	0,28 \pm 0,0087	0,33 \pm 0,013
Z	0,2	0,18 \pm 0,0058	0,21 \pm 0,010

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η τροφική αλλεργία επηρεάζει το 3-5% των ενηλίκων και 8% των παιδιών σε παγκόσμια κλίμακα. Μία αλλεργιογόνος πρωτεΐνη μπορεί να είναι επιβλαβής για έναν οργανισμό και να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση ακόμα και αν βρίσκεται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Για το λόγο αυτό, η αυστηρή αποφυγή κατανάλωσης τροφίμων που ενδέχεται να εμπεριέχουν αλλεργιογόνες πρωτεΐνες συνιστάται για το ποσοστό του πληθυσμού που παρουσιάζει τροφική αλλεργία. Με στόχο την προστασία των καταναλωτών, τόσο η Ευρωπαϊκή Ένωση όσο και ο FDA έχουν ορίσει κατευθυντήριες οδηγίες για τον έλεγχο και την υποχρεωτική αναγραφή της παρουσίας αλλεργιογόνων ουσιών στην ετικέτα των τροφίμων. Ειδικότερα οι βιομηχανίες τροφίμων, πραγματοποιούν προληπτική επισήμανση για πιθανή παρουσία αλλεργιογόνων, ακόμα και σε τρόφιμα που κανονικά δεν περιέχουν αλλεργιογόνα συστατικά, λόγω του υψηλού κινδύνου επιμόλυνσης που μπορεί να προκύψει σε διάφορα στάδια των γραμμών παραγωγής και ιδιαίτερα όταν παρασκευάζονται διαφορετικά είδη προϊόντων στις ίδιες εγκαταστάσεις σε κοινές γραμμές παραγωγής. Ως εκ τούτου, η απομάκρυνση των αλλεργιογόνων μέσω του καθαρισμού των κοινών γραμμών παραγωγής μίας βιομηχανίας τροφίμων θεωρείται ένα από τα πιο κρίσιμα στάδια ελέγχου για πιθανή παρουσία αλλεργιογόνων. Για την επικύρωση της αποτελεσματικότητας του καθαρισμού πραγματοποιείται έλεγχος δειγμάτων από τα διάφορα στάδια των γραμμών παραγωγής, καθώς επίσης και δειγμάτων από νερό έκπλυσης των σωληνώσεων των γραμμών παραγωγής της βιομηχανίας. Οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται μέχρι τώρα για την ανάλυση των δειγμάτων αυτών είναι κυρίως ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί και μέθοδοι που βασίζονται σε ανίχνευση DNA. Τα τελευταία χρόνια, λόγω των αυξημένων απαιτήσεων ελέγχων που προκύπτουν από την παγκοσμιοποίηση της αγοράς τροφίμων υπάρχει αυξημένη τάση για ανάπτυξη μεθόδων και συστημάτων που προσφέρουν ταχύτητα ανάλυσης, ταυτόχρονη ανίχνευση αλλεργιογόνων και δυνατότητα επιτόπιων μετρήσεων. Προς αυτή την κατεύθυνση, είναι έντονη η ερευνητική δραστηριότητα για την ανάπτυξη ανοσοαισθητήρων που θα μπορούσαν να καλύψουν αυτές τις απαιτήσεις.

Σε αυτά τα πλαίσια, στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της βοείου κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης, μέσω οπτικού ανοσοαισθητήρα σε νερά έκπλυσης σωληνώσεων βιομηχανίας τροφίμων, χωρίς τη χρήση ιχνηθετών. Ο

οπτικός ανοσοαισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή βασίζεται στη συμβολομετρία Mach-Zehnder (MZI). Σύμφωνα με αυτήν, σε ένα ολοκληρωμένο MZI, ένας επίπεδος κυματοδηγός χωρίζεται μέσω μίας Υ-σύνδεσης σε δύο βραχίονες, τον αισθητήριο βραχίονα, ο οποίος σε δεδομένη περιοχή είναι ανοιχτός για αλληλεπίδραση του κυματοδηγούμενου φωτός με το δείγμα, και τον βραχίονα αναφοράς, ο οποίος παραμένει καλυμμένος στοχεύοντας στη δημιουργία διαφοράς φάσης του κυματοδηγούμενου φωτός μεταξύ των βραχιόνων. Έτσι, όταν οι δύο βραχίονες συνδυαστούν και πάλι μετά από συγκεκριμένη απόσταση δημιουργείται ένα φάσμα συμβολής. Οι βιομοριακές αντιδράσεις στον αισθητήριο βραχίονα μεταβάλλουν τον ενεργό δείκτη διάθλασης του αισθητηρίου βραχίονα προκαλώντας μετατόπιση του φάσματος συμβολής προς μικρότερα μήκη κύματος. Η μετατόπιση του φάσματος μετά από διακριτό μετασχηματισμό Fourier μέσω του λογισμικού μετατρέπεται από το σε μεταβολή της φάσης η οποία αποτελεί το μετρήσιμο αναλυτικό σήμα.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκαν αρχικά ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί ανταγωνιστικού τύπου για κάθε μία από τις εν λόγω αλλεργιογόνες πρωτεΐνες σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης, προκειμένου να γίνει η επιλογή των αντισωμάτων αλλά και των συνθηκών του κάθε ανοσοπροσδιορισμού, με κριτήριο την επάρκεια του αναλυτικού σήματος και την ευαισθησία των αντίστοιχων καμπυλών βαθμονόμησης. Επιπλέον, ελήφθη μέριμνα ώστε να επιλεγούν κοινές συνθήκες για όλα τα αλλεργιογόνα με σκοπό να εφαρμοστούν κατά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους με οπτικό ανοσοαισθητήρα. Ως εκ τούτου, κατά την ανάπτυξη των ανοσοενζυμικών προσδιορισμών σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης επιλέχθηκαν τα ειδικά αντισώματα έναντι των τεσσάρων αλλεργιογόνων και η βέλτιστη συγκέντρωσή τους για την ανοσοανάλυση, προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση αλλεργιογόνων για ακινητοποίησή τους στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης και τα βέλτιστα ρυθμιστικά διαλύματα ακινητοποίησης, αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων της επιφάνειας των φρεατίων και ανοσοαντίδρασης. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της προεπώασης των προτύπων διαλυμάτων των αλλεργιογόνων με τα ειδικά έναντι αυτών αντισώματα στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη της χρονικής διάρκειας των ανοσοαντιδράσεων καθώς και της αντίδρασης με τα αντισώματα έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού ή/και κουνελιού. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιήθηκαν ως μέθοδοι σύγκρισης με τις αντίστοιχες μεθόδους που αναπτύχθηκαν στον οπτικό ανοσοαισθητήρα.

Για τον προσδιορισμό των τεσσάρων αλλεργιογόνων με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα, βελτιστοποιήθηκαν εκ νέου οι συνθήκες ανάλυσης, καθώς στον οπτικό ανοσοαισθητήρα δεν χρησιμοποιούνται ιχνηθετημένα μόρια για την ανίχνευση. Κατ' αρχήν, ελέγχθηκε η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν τα ίδια διαλύματα ανοσοαντίδρασης και έκπλυσης που είχαν επιλεγεί κατά τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης και βρέθηκε ότι η παρουσία του Tween 20 στα διαλύματα ανοσοαντίδρασης και έκπλυσης δεν επηρέαζε το λαμβανόμενο σήμα αλλά οδηγούσε σε σημαντική επιμήκυνση του χρόνου που απαιτείτο για την εξισορρόπηση του σήματος βάσης μετά την αναγέννηση των επιφανειών (>15 min), συγκριτικά με την περίπτωση που το διάλυμα έκπλυσης δεν περιείχε Tween 20. Ως εκ τούτου, για την ανάπτυξη των ανοσοχημικών προσδιορισμών των τεσσάρων πρωτεϊνών στον οπτικό ανοσοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα ανοσοαντίδρασης και έκπλυσης που δεν περιείχαν Tween 20.

Μία πολύ σημαντική παράμετρος για την επάρκεια αναλυτικού σήματος καθώς και την ομοιογένεια ακινητοποίησης των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στην επιφάνεια του αισθητήρα ήταν η επιλογή κατάλληλης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο διάλυμα ακινητοποίησης. Μετά από πειράματα που έγιναν σε βιοενεργοποιημένες ψηφίδες πυριτίου, στις οποίες είχε πραγματοποιηθεί εναπόθεση μικροκηλίδων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών διαφορετικών συγκεντρώσεων βρέθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση για ακινητοποίηση ήταν ≥ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ παράλληλα η διακύμανση του αναλυτικού σήματος μειωνόταν συνεχώς καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα ακινητοποίησης από 5 σε 100 mg/mL , όπου και επιτυχανόταν διακύμανση μικρότερη από 10%. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν μετά από TOF-SIMS ανάλυση, τόσο επιφανειών που προσομοίαζαν με την επιφάνεια των κυματοδηγών όσο και ψηφίδων πυριτίου της παρούσας διατριβής, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχες συγκεντρώσεις διαλυμάτων ακινητοποίησης και βρέθηκε ότι για συγκεντρώσεις ≥ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, υπήρξε ομοιογενής κατανομή της πρωτεΐνης στις επιφάνειες και στις ψηφίδες πυριτίου.

Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη δυνατότητα αναγέννησης των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών στον αισθητήριο βραχίονα της ψηφίδας, για την πραγματοποίηση διαδοχικών μετρήσεων. Μετά από έλεγχο διαφορετικών διαλυμάτων αναγέννησης για όλα τα ειδικά αντισώματα έναντι των τεσσάρων αλλεργιογόνων, βρέθηκε ότι το διάλυμα που παρείχε τη δυνατότητα απομάκρυνσης των αντισωμάτων από την ακινητοποιημένη στην ψηφίδα πυριτίου αλλεργιογόνο πρωτεΐνη, ήταν διάλυμα

HCl 50 mM. Επιπλέον, σχεδόν πλήρης αναγέννηση της ψηφίδας επετεύχθη για την κ-καζεΐνη, χρησιμοποιώντας τόσο το αντίσωμα 33-4G10 όσο και το 33-6A10, για την πρωτεΐνη σόγιας τα αντισώματα 26-5G4 και 26-6C9 και για τη γλιαδίνη το πολυκλωνικό αντίσωμα G-9144. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης φιστικιού βρέθηκε ότι το ειδικό αντίσωμα που είχε χρησιμοποιηθεί για τον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης δεν είχε την ικανότητα να απομακρυνθεί από την επιφάνεια της ψηφίδας, ενώ τα αντισώματα 44-4G2 και 51-5G9 παρείχαν ικανοποιητική αναγέννηση της επιφάνειας. Ακολούθησε βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ειδικών αντισωμάτων για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες. Στο σημείο αυτό, αξίζει να αναφερθεί ότι με χρήση των μιγμάτων των μονοκλωνικών αντισωμάτων για την κ-καζεΐνη, την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας, που περιγράφηκαν παραπάνω, επετεύχθη αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης μέσω μείωσης της συγκέντρωσης των αντισωμάτων, χωρίς ωστόσο να συνοδεύεται από μείωση του αναλυτικού σήματος.

Από πειράματα που έγιναν ως προς τη χρονική μελέτη με χρήση περισταλτικής αντλίας και ταχύτητα ροής 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, βρέθηκε ότι στα πρώτα 10 min ανοσοαντίδρασης ελήφθη επαρκές αναλυτικό σήμα και για τις τέσσερις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες. Προκειμένου να μειωθεί περαιτέρω ο χρόνος της ανάλυσης, καθώς και η κατανάλωση των ειδικών αντισωμάτων, εισήχθη ένα επιπλέον στάδιο που περιλάμβανε τη διέλευση δευτέρου αντισώματος ως μέσο ενίσχυσης του σήματος, πάνω από τη βιοενεργοποιημένη ψηφίδα για 5 min, αμέσως μετά το πέρας της ανοσοαντίδρασης που διαρκούσε επίσης 5 min.

Επιπλέον, έχοντας ως στόχο τη μείωση του χρόνου της ανάλυσης και την κατανάλωση των αντιδραστηρίων με ταυτόχρονη βελτίωση του ύψους του σήματος και της επαναληψιμότητας των μετρήσεων εντός της ίδιας ψηφίδας σχεδιάστηκαν και ελέγχθηκαν μικρορευστομηχανικές κυψελίδες με διαφορετικές. Η βέλτιστη διαμόρφωση επιλέχθηκε σε συνδυασμό με την ταχύτητα ροής χρησιμοποιώντας εισαγωγέα δείγματος συνδεδεμένο με βρόχο όγκου 100 μL . Βρέθηκε ότι με τη χρήση της κυψελίδας τύπου Γ και με ταχύτητα ροής, η οποία είχε ρυθμιστεί στα 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ ελήφθη 10-15% υψηλότερο σήμα σε σχέση με τις άλλες δύο διαμορφώσεις κυψελίδας και σημαντικά μικρότερη διακύμανση ($\text{CV}<6\%$), του σήματος μεταξύ των διαφορετικών MZIs που είχαν βιοενεργοποιηθεί με την ίδια αλλεργιογόνο πρωτεΐνη. Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα με τη χρήση της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας τύπου Γ επετεύχθη ομαλότερη ροή των διαλυμάτων πάνω από τα MZIs και αποτελεσματικότερη

διάχυση των ειδικών αντισωμάτων προς τα ακινητοποιημένα αλλεργιογόνα στην επιφάνεια της ψηφίδας. Με τις προαναφερθείσες συνθήκες βελτιστοποιήθηκε περαιτέρω ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ο οποίος ορίστηκε στα 400 s (200 s ειδικό αντίσωμα και 200 s δεύτερο αντίσωμα). Επομένως, με τη διαμόρφωση του διαλύου που επιλέχθηκε σε συνδυασμό με τον εισαγωγέα δείγματος σταθερού όγκου και τη χρήση δευτέρου αντισώματος μειώθηκε κατά 80% η κατανάλωση ειδικών αντισωμάτων και κατά 35% ο χρόνος της ανάλυσης σε σύγκριση με τη μέθοδο που χρησιμοποιούσε μόνο ειδικό αντίσωμα.

Κατά τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών παρατηρήθηκε ότι η προεπάσση των προτύπων διαλυμάτων με τα αντίστοιχα ειδικά αντισώματα βελτίωνε σημαντικά την ευαισθησία της ανίχνευσης. Ωστόσο, για την ανίχνευση των πρωτεϊνών αυτών μέσω οπτικού ανοσοαισθητήρα χρησιμοποιούνται πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τόσο των αλλεργιογόνων πρωτεϊνών για την επικάλυψη των ψηφίδων, όσο και των ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτών και η προεπάσση μπορεί να επιδράσει διαφορετικά στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Μετά από 10 min προεπάσσης παρατηρήθηκε ότι υπήρξε σημαντική βελτίωση στην ευαισθησία της ανίχνευσης της κ-καζεΐνης και της γλαδίνης, ενώ για την πρωτεΐνη φιστικιού και την πρωτεΐνη σόγιας δεν υπήρξε σημαντική διαφορά για κανέναν από τους χρόνους προεπάσσης που δοκιμάστηκαν. Προκειμένου όμως να επιτευχθεί ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών στην ίδια ψηφίδα επιλέχθηκε ο χρόνος προεπάσσης των 10 min.

Η επίδραση της μήτρας του δείγματος, η οποία είχε προηγουμένως μελετηθεί στα πλαίσια του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού στα φρεάτια μικροπιπλοδότησης, διερευνήθηκε εκ νέου λόγω του ότι στην τελευταία περίπτωση η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε σε πραγματικό χρόνο και χωρίς τη χρήση ιχνηθετών. Μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από πρότυπα παρασκευασμένα σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης, αλλά και σε νερό δικτύου, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της μήτρας του δείγματος στο αναλυτικό σήμα και στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Ως εκ τούτου, για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα ανοσοαντίδρασης προκειμένου να εξασφαλιστεί η σταθερότητά τους κατά τη φύλαξη.

Βάσει των τελικών συνθηκών επετεύχθη ταυτόχρονος προσδιορισμός των τεσσάρων αλλεργιογόνων στην ίδια ψηφίδα πυριτίου, κατά τον οποίο οι αποκρίσεις που ελήφθησαν για κάθε αλλεργιογόνο πρωτεΐνη ήταν παρεμφερείς με

εκείνες που ελήφθησαν όταν η ψηφίδα είχε βιοενεργοποιηθεί με μία μόνο αλλεργιογόνο πρωτεΐνη. Από πειράματα ειδικότητας διαπιστώθηκε ότι για καθεμία από τις αλλεργιογόνες πρωτεΐνες, απόκριση ελήφθη μόνο από τα MZIs τα οποία είχαν τροποποιηθεί με την αντίστοιχη αλλεργιογόνο πρωτεΐνη. Επομένως, δεν παρατηρήθηκε καμία αλληλεπίδραση των αντισωμάτων έναντι της μίας πρωτεΐνης με τις υπόλοιπες. Μετά από πειράματα ανάκτησης και γραμμικότητας, η μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τεσσάρων αλλεργιογόνων κρίθηκε ακριβής. Στη συνέχεια, η αναπτυχθείσα μέθοδος αξιολογήθηκε με δείγματα νερού που παρασχέθηκαν από μεγάλη Ελληνική γαλακτοβιομηχανία (ΔΕΛΤΑ), τόσο από το πρώτο στάδιο έκπλυσης όσο και από το τελικό στάδιο καθαρισμού των σωληνώσεων της βιομηχανίας, καθώς επίσης και με δείγματα από βαμβακοφόρους στείλους που παρεσχέθησαν από μεγάλη διεθνή εταιρεία αναλύσεων τροφίμων (EUROFINS). Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα και με τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή. Οι τιμές που ελήφθησαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων νερού έκπλυσης και με τις δύο μεθόδους ήταν εφάμιλλες και είχαν εξαιρετική συσχέτιση με τις αναμενόμενες από τη γαλακτοβιομηχανία. Επίσης, οι τιμές που ελήφθησαν για τους βαμβακοφόρους στείλους με τον ανοσοαισθητήρα συγκρίνονταν πολύ καλά με εκείνες που ελήφθησαν κατόπιν αναλύσεως αντιδειγμάτων από την εταιρεία EUROFINS, με χρήση εμπορικά διαθέσιμης συσκευασίας ανοσοχημικού προσδιορισμού (RIDASCREEN). Ως εκ τούτου, ο οπτικός ανοσοαισθητήρας είναι κατάλληλος για τον ποσοτικό προσδιορισμό σε δείγματα νερού έκπλυσης από βιομηχανικές εγκαταστάσεις αλλά και σε βαμβακοφόρους στείλους.

Για την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων και την πραγματοποίηση διαδοχικών μετρήσεων ήταν σημαντική η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των βιοενεργοποιημένων ψηφίδων, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί το κόστος της ανάλυσης. Στην κατεύθυνση αυτή ελέγχθηκαν διαφορετικά διαλύματα αναγέννησης, καθώς και η χρονική διάρκεια διέλευσής τους και βρέθηκε ότι με χρήση διαλύματος HCl 50 mM για 3 min, επετεύχθη σχεδόν πλήρης αναγέννηση της βιοενεργοποιημένης ψηφίδας. Με τις συνθήκες αυτές διαπιστώθηκε ότι η βιοενεργοποιημένη ψηφίδα είχε τη δυνατότητα να αναγεννηθεί τουλάχιστον είκοσι φορές στην περίπτωση της κ-καζεΐνης και της γλιαδίνης, ενώ στην περίπτωση της πρωτεΐνης φιστικιού και της πρωτεΐνης σόγιας δώδεκα φορές. Επιπλέον, ελέγχθηκε η σταθερότητα των βιοενεργοποιημένων ψηφίδων κατά τη φύλαξη και διαπιστώθηκε ότι ήταν σταθερές για διάστημα τουλάχιστον ενός μήνα.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αρκετές μέθοδοι για την ανίχνευση αλλεργιογόνων πρωτεϊνών σε τρόφιμα μέσω ανοσοαισθητήρων (πίνακας 18). Πιο συγκεκριμένα, έχουν αναπτυχθεί ηλεκτροχημικοί ανοσοαισθητήρες με χρήση ιχνηθετών (HRP, αλκαλική φωσφατάση), για τον προσδιορισμό μεμονωμένων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, όπως η γλιαδίνη, η Ara h1 και η Ara h6 [167-169]. Τα όρια ανίχνευσης ήταν χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα που ελήφθησαν με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα, ωστόσο ο χρόνος που απαιτείτο για την ανάλυση υπερέβαινε σε όλες τις περιπτώσεις τα 60 min. Επιπλέον, στη βιβλιογραφία αναφέρονται δύο ηλεκτροχημικοί αισθητήρες, οι οποίοι δεν περιλαμβάνουν ιχνηθέτη, για τον βολταμετρικό προσδιορισμό καζεΐνης καθώς και γλιαδίνης μέσω φασματοσκοπίας ηλεκτρικής εμπέδησης [166,170]. Τα όρια ανίχνευσης των δύο αυτών μεθόδων είναι παρεμφερή με αυτά που ελήφθησαν με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα της παρούσας διατριβής. Παρ' όλα αυτά, ο χρόνος ανάλυσης και για τις δύο περιπτώσεις ήταν ≥ 30 min. Από την άλλη πλευρά, έχουν αναπτυχθεί δύο ηλεκτροχημικοί αισθητήρες για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δύο αλλεργιογόνων πρωτεϊνών, της Ara h1 και της Ara h2 σε αλεύρι και μπάρες σοκολάτας καθώς και της καζεΐνης και της b-IgG σε αγελαδινό γάλα [171,172]. Τα όρια ανίχνευσης και για τις δύο περιπτώσεις ήταν χαμηλότερα σε σχέση με τον αναπτυχθέντα ανοσοαισθητήρα, ενώ ο χρόνος της ανάλυσης ήταν μεγαλύτερος από 20 min. Επιπρόσθετα και στις δύο περιπτώσεις για την ανάλυση απαιτήθηκε η χρήση ιχνηθετών (HRP και κβαντικές κουκίδες μολύβδου και καδμίου). Στη βιβλιογραφία έχουν επίσης αναφερθεί δύο ανοσοαισθητήρες που βασίζονται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, για τον προσδιορισμό γλιαδίνης. Παρ' ότι η ανάλυση πραγματοποιείται χωρίς τη χρήση ιχνηθετών, ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση και στις δύο περιπτώσεις είναι ≥ 40 min [177,178].

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κατηγορία οπτικών ανοσοαισθητήρων, η οποία δε χρησιμοποιεί ιχνηθέτες είναι οι αισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (SPR). Η κατηγορία αυτή διακρίνεται ως προς την ευαισθησία της ανίχνευσης και την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, ωστόσο η πολυπλοκότητα της κατασκευής καθώς επίσης και το κόστος ενός ανοσοαισθητήρα SPR είναι πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με τους προαναφερθέντες αισθητήρες και τον οπτικό ανοσοαισθητήρα της παρούσας διατριβής. Επιπλέον, το μέγεθος μίας συσκευής SPR δεν ενδείκνυται για μετρήσεις πεδίου. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί ορισμένες μέθοδοι που βασίζονται σε SPR για τον προσδιορισμό μεμονωμένων αλλεργιογόνων και κυρίως καζεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, με χρήση της εμπορικά διαθέσιμης διάταξης Biacore 3000 έχουν αναπτυχθεί δύο μέθοδοι για τον

προσδιορισμό βοείου β-καζεΐνης σε γάλα και τυρί και τον προσδιορισμό κ-καζεΐνης σε γάλα [203,206]. Και στις δύο περιπτώσεις, τα όρια ανίχνευσης ήταν αντίστοιχα με εκείνα που ελήφθησαν με τον οπτικό αισθητήρα της παρούσας διατριβής, ενώ ο χρόνος της ανάλυσης ήταν 10 min. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό α-καζεΐνης, ως δείκτη για την ανίχνευση της παρουσίας γάλακτος σε δείγματα νερού έκπλυσης σωληνώσεων από βιομηχανίες τροφίμων χρησιμοποιώντας τη συσκευή Sierra Sensor SPR2/4 [204]. Το όριο ανίχνευσης που ελήφθη ήταν 58 ng/mL, ενώ ο χρόνος της ανάλυσης ήταν περίπου ο μισός από αυτόν που απαιτήθηκε κατά την ανάπτυξη του οπτικού ανοσοαισθητήρα της παρούσας διατριβής. Μία άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη αναφέρεται στην ανάπτυξη εντοπισμένου SPR (L-SPR) για τον ανοσοχημικό προσδιορισμό καζεΐνης σε γάλα [207]. Το όριο ανίχνευσης ήταν οχτώ φορές μικρότερο από εκείνο που ελήφθη με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα, ωστόσο η ανάλυση διαρκούσε 30 min. Στη βιβλιογραφία έχει επίσης αναφερθεί μέθοδος για τον προσδιορισμό της Ara h1 σε σακχαρόπηκτα σοκολάτας χρησιμοποιώντας πρωτότυπη διάταξη SPR, που βασιζόταν σε επιχρυσωμένη οπτική ίνα [205]. Κατά την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια γυαλιού για την ενίσχυση του σήματος. Το όριο ανίχνευσης ήταν 90 ng/mL, ενώ η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 min. Παράλληλα στη βιβλιογραφία αναφέρονται και δύο μέθοδοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αλλεργιογόνων στο ίδιο δείγμα. Το 2001 με τη συσκευή Biacore 3000 αναπτύχθηκε ανοσοαισθητήρας για την ταυτόχρονη ανίχνευση πρωτεϊνών σόγιας, φιστικιού και σιταριού σε σκόνη γάλακτος [210]. Η ανάλυση διαρκούσε 5 min και το όριο ανίχνευσης και για τους τρεις αναλύτες ήταν χαμηλότερο από 0,1% κατά βάρος. Επιπλέον, με εφαρμογή της μικροσκοπίας/απεικόνισης SPR (i-SPR) αναπτύχθηκε αισθητήρας για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δεκατριών αλλεργιογόνων σε μπισκότα και σοκολάτα υγείας, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονταν η πρωτεΐνη σόγιας, η πρωτεΐνη φιστικιού και η βόειος κ-καζεΐνη [211]. Η ανάλυση ολοκληρωνόταν εντός 7 min, ωστόσο τα όρια ανίχνευσης που επετεύχθησαν ήταν αρκετά υψηλότερα σε σχέση με τις προαναφερθείσες μεθόδους και με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα της παρούσας διατριβής.

Πίνακας 18: Μέθοδοι για την ανίχνευση των τεσσάρων αλλεργιογόνων πρωτεϊνών με αισθητήρες.

Ανοσοαισθητήρας	Ιχνηθέτης	Αλλεργιογόνα	Χρόνος	LOD	Αναφορές
Ηλεκτροχημικός βολταμετρικός ανοσοαισθητήρας	--	Καζεΐνη	30 min	50 ng/mL	172
Ηλεκτροχημικός αμπερομετρικός ανοσοαισθητήρας	HRP	Γλιαδίνη		24,2 ng/mL	173
Ηλεκτροχημικός βολταμετρικός ανοσοαισθητήρας	Αλκαλική φωσφατάση	Ara h1	3h και 50 min	3,8 ng/mL	174
Ηλεκτροχημικός βολταμετρικός ανοσοαισθητήρας	Αλκαλική φωσφατάση	Ara h6	1 h	0,27 ng/mL	175
Ηλεκτροχημικός αισθητήρας εμπέδησης	--	Γλιαδίνη	1 h	0,2 µg/mL	176
Ηλεκτροχημικός αμπερομετρικός ανοσοαισθητήρας	HRP	Ara h1 Ara h2	2 h	18 ng/mL 0,07 ng/mL	177
Ηλεκτροχημικός βολταμετρικός ανοσοαισθητήρας	Streptavidin-PbS Qdots	Καζεΐνη	20 min	0,04 µg/mL	178
Πιεζοηλεκτρικός ανοσοαισθητήρας	--	γλιαδίνη	40 min	8 ng/mL	183
Πιεζοηλεκτρικός ανοσοαισθητήρας	--	Γλιαδίνη	53 min	4 µg/mL	184
Πιεζοηλεκτρικός ανοσοαισθητήρας	--	PSS 208 (αγελαδινό γάλα)	<30 min	1 µg/mL	185
SPR	--	β- καζεΐνη	10 min	85 ng/mL	210
Ανοσοαισθητήρας SPR Sierra 2/4	--	α-καζεΐνη	3 min	58 ng/mL	211
SPR με οπτική ίνα	νανο σωματίδια γυαλιού	Ara h1	20 min	0,09 µg/mL	212
SPR	--	κ-καζεΐνη	10 min	0,45 µg/mL	213
L-SPR	--	καζεΐνη	30 min	10 ng/mL	214
SPR (Spreeta)	--	αγελαδινό σε κατσικίσιο/	7 min	0,17% (ο/ο)	215

		πρόβειο γάλα			
SPR	--	αγελαδινό σε κατσικίσιο/ πρόβειο γάλα	5 min	0,1% (o/o)	216
SPR (Biacore 3000)	--	πρωτεΐνη σόγιας, φιστικιού, σιταριού	5 min	0.05%, 0.004%	217
i-SPR	--	κ-καζεΐνη, πρωτεΐνη σόγιας, φιστικιού	7 min	200 µg/g, 3200 µg/g, 5000 µg/g	218
Ανοσοαισθητήρας Mach-Zehnder	--	αγελαδινό σε κατσικίσιο γάλα, κ-καζεΐνη	10 min	0,04% o/o), 0,06 µg/mL	
Ανοσοαισθητήρας Mach-Zehnder	--	κ-καζεΐνη, γλιαδίνη, πρωτεΐνη σόγιας, φιστικιού	6,5 min	30 ng/mL, 700 ng/mL, 980 ng/mL, 140 ng/mL	

Ο οπτικός ανοσοαισθητήρας της παρούσας διατριβής αξιολογήθηκε επίσης ως προς την ικανότητα ανίχνευσης αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο/πρόβειο γάλα. Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν αρχικά μέθοδοι ανοσοενζυμικού προσδιορισμού ανταγωνιστικού και μη ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Η ανταγωνιστικού τύπου μέθοδος βασίστηκε στη μέθοδο που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό κ-καζεΐνης σε νερό έκπλυσης. Και στις δύο διαμορφώσεις ανοσοενζυμικού προσδιορισμού διερευνήθηκε η επίδραση της αραίωσης του κατσικίσιου/πρόβειου γάλακτος, καθώς επίσης και της θερμικής κατεργασίας του κατσικίσιου/πρόβειου και του αγελαδινού γάλακτος στο αναλυτικό σήμα και στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν, η αραίωση του κατσικίσιου/πρόβειου γάλακτος δεν είχε ιδιαίτερη επίδραση στον ανοσοενζυμικό προσδιορισμό και με τις δύο διαμορφώσεις. Αντίθετα, παρατηρήθηκε ότι η θερμική επεξεργασία του αγελαδινού γάλακτος επηρέαζε αρνητικά την ευαισθησία της ανίχνευσης όταν εφαρμόστηκε μη ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικός προσδιορισμός, ενώ δεν είχε καμία επίδραση όταν ακολουθήθηκε ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικός προσδιορισμός. Σύμφωνα με τα αναλυτικά χαρακτηριστικά που ελήφθησαν από τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό, η μέθοδος κρίθηκε ακριβής και αξιόπιστη.

Στα πλαίσια της ανάπτυξης του οπτικού ανοσοαισθητήρα, επτά MZIs τροποποιήθηκαν με κ-καζεΐνη, ενώ τα εναπομείναντα τρία με BSA, προκειμένου να προσδιορισθεί το σήμα μη ειδικής δέσμησης και ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων επιλέχθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, pH 7,4 που περιείχε 1% φρέσκο κασικίσιο γάλα, λόγω της σχεδόν μηδενικής μη ειδικής δέσμησης και της ταχύτερης εξισορρόπησης που επετεύχθη στον αισθητήρα. Δεδομένου ότι τα συστατικά του γάλακτος μπορούν να επηρεάσουν την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος και ότι η μέτρηση με τον αισθητήρα βασίζεται στην αλληλεπίδραση του φθίνοντος κύματος με το δείγμα στην εγγύτητα της επιφάνειας του κυματοδηγού, ελέγχθηκε και πάλι η επίδραση της αραίωσης του κασικίσιου/πρόβειου γάλακτος και διαπιστώθηκε ότι το αναλυτικό σήμα ήταν ανεξάρτητο της αραίωσης του κασικίσιου γάλακτος. Ως εκ τούτου, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας του κασικίσιου/πρόβειου γάλακτος σε αγελαδινό κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές αραιώσεις. Στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε πενήντα φορές αραίωση των προτύπων αγελαδινού γάλακτος σε κασικίσιο, έτσι ώστε το δυναμικό εύρος της ανάλυσης να είναι από 0-1% (o/o). Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση περισταλτικής αντλίας και ταχύτητα ροής 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, εντός 10 min. Ωστόσο, προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος της αντίδρασης και η κατανάλωση των ειδικών αντισωμάτων, εισήχθη και σε αυτή την περίπτωση ένα στάδιο ενίσχυσης του σήματος μετά την ανοσοαντίδραση με χρήση δευτέρου αντισώματος. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε εισαγωγέας δείγματος συνδεδεμένος με βρόχο 100 μL , έτσι ώστε ο όγκος των αντιδραστηρίων που διαβιβάζεται πάνω από την ψηφίδα να είναι σταθερός. Έτσι, ο ανοσοχημικός προσδιορισμός αγελαδινού γάλακτος με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα, που πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια, ολοκληρώθηκε εντός 5 min, και παρείχε 10% υψηλότερο σήμα σε σχέση με την ανάλυση σε ένα στάδιο, χωρίς να επηρεάζεται η ευαισθησία και το δυναμικό εύρος της καμπύλης βαθμονόμησης.

Βάσει του τελικού πρωτοκόλλου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης και γραμμικότητας αραίωσης δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης και η μέθοδος κρίθηκε ακριβής. Για την περαιτέρω αξιολόγηση της μεθόδου, αναλύθηκαν δείγματα πρόβειου γάλακτος γνωστής περιεκτικότητας σε αγελαδινό γάλα που παρασκευάστηκαν από την εταιρεία ΔΕΛΤΑ και αναλύθηκαν τόσο με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα, όσο και με τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Οι τιμές που ελήφθησαν μετά την ανάλυση όλων των δειγμάτων με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ήταν σε καλή

συμφωνία τόσο με τον ανταγωνιστικού τύπου ανοσοενζυμικό προσδιορισμό όσο και με την αρχική προσθήκη που είχε πραγματοποιηθεί στα δείγμα προβείου γάλακτος από την εταιρεία.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται τρεις ανοσοαισθητήρες για τον προσδιορισμό αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο/πρόβειο γάλα. Οι δύο από αυτούς χρησιμοποιούν ανοσοαισθητήρα SPR και έχουν την ικανότητα να προσδιορίσουν αγελαδινό γάλα εντός 7 min και 5 min, με όρια ανίχνευσης 0,17% (ο/ο) και 0,1% (ο/ο), αντίστοιχα [208,209]. Αξίζει να αναφερθεί η ανάπτυξη ενός πιεζοηλεκτρικού ανοσοαισθητήρα κατά την οποία η ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος πραγματοποιείται μέσω ενός συγκεκριμένου τμήματος πρωτεΐνης (PSS 208), το οποίο βρίσκεται μόνο στο αγελαδινό γάλα [179]. Η ανάλυση πραγματοποιείται σε χρόνο <30 min και το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 1 µg/mL.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, δημοσιεύθηκε εργασία για την ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο εντός 10 min, με όριο ανίχνευσης το 0,04% (ο/ο). Με περαιτέρω βελτιστοποιήσεις, ο χρόνος ανάλυσης μειώθηκε στα 5 min και το όριο ανίχνευσης παρέμεινε το ίδιο. Ως εκ τούτου, η μέθοδος που αναπτύχθηκε με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα της παρούσας διατριβής είναι ταχεία και έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης σε σχέση με τις προαναφερθείσες μεθόδους της βιβλιογραφίας.

Συμπερασματικά, με τον αναπτυχθέντα ανοσοαισθητήρα καθίσταται δυνατός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός της κ-καζεΐνης, της πρωτεΐνης φιστικιού, της πρωτεΐνης σόγιας και της γλιαδίνης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και σε χρόνο < 7 min με μεγάλη ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Επιπλέον, με το συγκεκριμένο ανοσοαισθητήρα επιτυγχάνεται η ανίχνευση αγελαδινού γάλακτος σε κατσικίσιο/πρόβειο γάλα σε σύντομο χρονικό διάστημα και με όριο ανίχνευσης μικρότερο από τους αντίστοιχους ανοσοαισθητήρες της βιβλιογραφίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Major Histocompatibility Complex	Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
Food and Drug Administration	Παγκόσμιος Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφίμων
Swabs	Βαμβακοφόροι στειλεοί
Radioallergosorbent test	Ράδιο-προσροφητικά τεστ
Enzyme allergosorbent test	Ένζυμο-προσροφητικά τεστ
Radioimmunoassay	Ραδιοανασοχημικοί προσδιορισμοί
Rocket Immuno Electrophoresis	Rocket ανοσο-ηλεκτροφόρηση
Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Dot immunoblotting	Ανοσοαποτύπωση κηλίδων
Bovine Serum Albumin	Αλβουμίνη ορού βοός
Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία
Capillary Electrophoresis	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography	Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης υψηλής απόδοσης
Mass Spectrometry	Φασματομετρία μάζας
<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>	
<i>Electrospray ionization</i>	Ηλεκτροψεκασμός
Time Of Flight	Αναλυτής χρόνου πτήσης
Ion Trap	Αναλυτής παγίδας ιόντων
Limit Of Detection	Όριο ανίχνευσης
Dipstick tests	Δοκιμασία εμβάπτισης

Screen Printed Electrodes	Εκτυπωμένα ηλεκτρόδια πλέγματος
Surface Acoustic Wave	Επιφανειακό ακουστικό κύμα
Bulk Acoustic Wave	Ακουστικό κύμα όγκου
Quartz Crystal Microbalance	Μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία
Evanescence wave	Φθίνον κύμα
Optrodes	Οπτρόδια
Surface Plasmon Resonance	Συντονισμός επιφανειακών πλάσμονίων
Cladding layer	Προστατευτικό κάλυμμα
Sulfo-NHS-LC-Biotin	6-[(βιοτινοϋλο)αμινο]εξανοϊκό οξύ
Mach-Zehnder Interferometer	Συμβολόμετρο Mach-Zehnder
Radians	Ακτίνια
Hazard Analysis and Critical Control Point	Ανάλυση Κινδύνων και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου
Whey proteins	Πρωτεΐνες ορού γάλακτος
Cross - link	Διασταυρούμενη αντίδραση
Lamina propria	Μαλακή στιβάδα
Molecular beacon	Μοριακός φάρος
Quencher dye	Ομάδα απόσβεσης φθορισμού
Codex Alimentarius Commission	Επιτροπή τροφίμων

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

IgE	Ανοσοσφαιρίνες Ε
IgG	Ανοσοσφαιρίνες Γ
IgM	Ανοσοσφαιρίνες Μ
IgA	Ανοσοσφαιρίνες Α
MHC	Major Histocompatibility Complex
Th2	T2 βοηθητικά κύτταρα
SIgA	Εκκριτικές ανοσοσφαιρίνες Α
BSA	Bovine Serum Albumin
GMP	Καζεΐνομακροπεπτίδιο
TG2	Ιστική τρανσγλουταμινάση 2
IFN-γ	Ιντερφερόνη γ
IL-21	Ιντερλευκίνη-21
IL-15	Ιντερλευκίνη-15
FDA	Food and Drug Administration
ΠΟΠ	Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης
CIP	Cleaning in place
COP	Cleaning on place
HACCP	Hazard analysis and critical control points
RAST	Radioallergosorbent test
EAST	Enzyme allergosorbent test
RIA	Radioimmunoassay
RIE	Rocket Immuno Electrophoresis
SDS-PAGE	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου
PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
PVDF	Φθοριούχο πολυβινυλιδένιο
LC	Liquid Chromatography
CE	Capillary Electrophoresis
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Ara h1	Αραχιδίνη 1
Ara h2	Αραχιδίνη 2
Ara h3	Αραχιδίνη 3
Ara h6	Αραχιδίνη 6
Ab	Αντίσωμα
Ag	Αντιγόνο
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
ESI	Electrospray ionization
TOF	Time Of Flight
IT	Ion Trap
MLPA	Multiplex-Ligation Probe Amplification
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Όριο ποσοτικοποίησης
CV	Συντελεστής διακύμανσης
SD	Τυπική απόκλιση
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
SPE	Screen Printed Electrodes
SAW	Surface Acoustic Wave
BAW	Bulk Acoustic Wave
QCM	Quartz Crystal Microbalance
TIRF	Ολική εσωτερική ανάκλαση φθορισμού
SPR	Surface Plasmon Resonance
CEA	Καρκινοεμβρυικό αντιγόνο
AFP	α-Φετοπρωτεΐνη
PSA	Ειδικό προστατικό αντιγόνο
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης α
IL-8	Ιντερλευκίνη 8
ISPR	Imaging Surface Plasmon Resonance
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance
CCD	Charged-coupled source

RIU	Refractive Index Units
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
ABTS	2,2-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-)σουλφονικό οξύ
HRP	Υπεροξειδάση της ραπανάδος
str	Streptavidin
APTES	(3-αμινοπροπυλο) τριαθοξυσιλάνιο
MZI	Mach-Zehnder Interferometer
PMMA	Πολύ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)
PBS	Phosphate Buffer Solution
b-BSA	Biotinylated Bovine Serum Albumin
Gly m-5	β- κονγλυκινίνη
Gly m-6	Γλυκινίνη

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. J. A. Boyce, A. Assa'ad, A. W. Burks, S. M. Jones, H. A. Sampson, R. A. Wood, M. Plaut, S. F. Cooper, M. J. Fenton, S. H. Arshad, S. L. Bahna, L. A. Beck, C. Byrd-Bredbenner, C. A. Camargo, L. Eichenfield, G. T. Furuta, J. M. Hanifin, C. Jones, M. Kraft, B. D. Levy, P. Lieberman, S. Lucciolli, K. M. McCall, L. C. Schneider, R. A. Simon, F. E. R. Simons, S. J. Teach, B. P. Yawn, J. M. Schwaninger, Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 126, pp. 1105-1118.
2. A. Ferguson, Definitions and Diagnosis of Food Intolerance and Food Allergy - Consensus and Controversy, *J. Pediatr.-Us*, 1992, Vol. 121, pp. S7-S11.
3. R. Valenta, H. Hochwallner, B. Linhart, S. Pahr, Food Allergies: The Basics, *Gastroenterology*, 2015, Vol. 148, pp. 1120-1131.
4. J. E. Devries, J. F. Gauchat, G. G. Aversa, J. Punnonen, H. Gascan, H. Yssel, Regulation of Ige Synthesis by Cytokines, *Curr. Opin. Immunol.*, 1991, Vol. 3, pp. 851-858.
5. S. Romagnani, Human Th1 and Th2 Subsets - Doubt No More, *Immunol. Today*, 1991, Vol. 12, pp. 256-257.
6. S. B. Lehrer, W. E. Horner, G. Reese, Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology, *Crit. Rev. Food Sci.*, 1996, Vol. 36, pp. 553-564.
7. S. L. Taylor, S. B. Lehrer, Principles and characteristics of food allergens, *Crit Rev Food Sci.*, 1996, Vol. 36, pp. S91-S118.
8. S. L. Taylor, S. L. Hefle, Allergic reactions and food intolerances 2nd Ed. FN Kotsonis & M. A. Mackey, eds., London: Taylor and Francis, 2002.
9. S. H. Sicherer, Epidemiology of food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, pp. 594-602.
10. W. M. Blom, B. J. Vlieg-Boerstra, A. G. Kruizinga, S. van der Heide, G. F. Houben, A. E. J. Dubois, Threshold dose distributions for 5 major allergenic foods in children, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, pp. 172-179.
11. E. Eller, T. K. Hansen, C. Bindslev-Jensen, Clinical thresholds to egg, hazelnut, milk and peanut: results from a single-center study using standardized challenges, *Ann. Allerg. Asthma Im.*, 2012, Vol. 108, pp. 332-336.
12. Leo M.L. Nollet, Arjon J. van Hengel, Food allergens: analysis instrumentation and methods, CRC Press, 2010.

13. J. S. Stanley, G. A. Bannon, Biochemistry of food allergens, *Clin. Rev. Allerg. Immu.*, 1999, Vol. 17, pp. 279-291.
14. S. Steckelbroeck, B. K. Ballmer-Weber, S. Vieths, Potential, pitfalls, and prospects of food allergy diagnostics with recombinant allergens or synthetic sequential epitopes, *J. Allergy Clin. Immun.*, 2008, Vol. 121, pp. 1323-1330.
15. S. H. Sicherer, H. A. Sampson, Food allergy, *J. Allergy Clin. Immun.*, 2006, Vol. 117, pp. S470-S475.
16. H. Breiteneder, C. Ebner, Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens, *J. Allergy Clin. Immun.*, 2000, Vol. 106, pp. 27-36.
17. G. A. Bannon, T. Ogawa, Evaluation of available IgE-binding epitope data and its utility in bioinformatics, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, Vol. 50, pp. 638-644.
18. L. S. Jackson, F. M. Al-Taher, M. Moorman, J. W. DeVries, R. Tippett, K. M. J. Swanson, T. J. Fu, R. Salter, G. Dunaif, S. Estes, S. Albillos, S. M. Gendel, Cleaning and other control and validation strategies to prevent allergen cross-contact in food-processing operations, *J. Food Protect.*, 2008, Vol. 71, pp. 445-458.
19. Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC regarding certain food ingredients Commission of the European Communities, *Off. J. Eur. Union.*, pp. 11-14.
20. Regulation (EU) No 1169/2011 of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers The European Parliament and the Council of the European Union, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. , *Off. J. Eur. Union.*, Vol. 1L304, pp. 18-63.
21. S. H. Sicherer, H. A. Sampson, Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment, *J. Allergy Clin. Immun.*, 2014, Vol. 133, pp. 291-307.
22. P.F. Fox, T. Uniacke-Lowe, P. L. H. Sweeney, J. A. O'Mahony, Dairy Chemistry and Biochemistry, Springer 2015.
23. P. F. Fox, A. L. Kelly, Developments in the chemistry and technology of milk proteins - 4. Some recent research findings and overview of possible future developments, *Food Aust.*, 2003, Vol. 55, pp. 537-539.
24. L. Monaci, V. Tregoat, A. J. van Hengel, E. Anklam, Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, Vol. 223, pp. 149-179.

25. J. M. Wal, Structure and function of milk allergens, *Allergy*, 2001, Vol. 56, pp. 35-38.
26. W. N. Eigel, J. E. Butler, C. A. Ernstrom, H. M. Farrell, V. R. Harwalkar, R. Jenness, R. M. Whitney, Nomenclature of Proteins of Cows Milk - 5th Revision, *J. Dairy Sci.*, 1984, Vol. 67, pp. 1599-1631.
27. L. K. Creamer, J. E. Plowman, M. J. Liddell, M. H. Smith, J. P. Hill, Micelle stability: kappa-casein structure and function, *J. Dairy Sci.*, 1998, Vol. 81, pp. 3004-3012.
28. C. Thoma-Worringer, J. Sorensen, R. Lopez-Findino, Health effects and technological features of caseinomacropeptide, *Int. Dairy J.*, 2006, Vol. 16, pp. 1324-1333.
29. Neelima, R. Sharma, Y. S. Rajput, and B. Mann, Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review, *Dairy Sci. Techno.I*, 2013, Vol. 93, pp. 21-43.
30. W. K. A. da Costa, E. L. de Souza, E. M. Beltrao, G. K. V. Vasconcelos, T. Santi-Gadelha, C. A. D. Gadelha, O. L. Franco, R. D. R. D. Queiroga, M. Magnani, Comparative Protein Composition Analysis of Goat Milk Produced by the Alpine and Saanen Breeds in Northeastern Brazil and Related Antibacterial Activities, *Plos One*, 2014, Vol. 9, pp. 1-8.
31. European Parliament and Council, *Off. J. Eur. Communities*, 2000, pp. L109:129–142
32. European Parliament and Council, *Off. J. Eur. Communities*, 2003, pp. L308:315–318
33. European Commission EC 213/2001, Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products, *Off. J. Eur. Comm.*, 2001, Vol. 44, pp. L37/31-L37/99.
34. C. Maudet, P. Taberlet, Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism, *J. Dairy Res.*, 2001, Vol. 68, pp. 229-235.
35. B. Shatenstein, P. Ghadirian, Influences on diet, health behaviours and their outcome in select ethnocultural and religious groups, *Nutrition*, 1998, Vol. 14, pp. 223-230.
36. W. M. Becker, U. Jappe, Peanut allergens, *Chem. Immunol. Allergy*, 2014, Vol. 100, pp. 256-267.
37. S. J. Koppelman, S. Jayasena, D. Luykx, E. Schepens, D. Apostolovic, G. A. H. de Jong, T. G. Isleib, J. Nordlee, J. Baumert, S. L. Taylor, H. Cheng, S. Maleki,

- Allergenicity attributes of different peanut market types, *Food Chem. Toxicol.*, 2016, Vol. 91, pp. 82-90.
38. H. W. Wen, W. Borejsza-Wysocki, T. R. DeCory, R. A. Durst, Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products, *Compr. Rev. Food Sci. F*, 2007, Vol. 6, pp. 47-58.
 39. J. O. Hourihane, Peanut Allergy, *Pediatr. Clin. N. Am.*, 2011, Vol. 58, pp. 445-448.
 40. C. L. Hoffpauir, Peanut Composition - Relation to Processing and Utilization, *J. Agr. Food Chem.*, 1953, Vol. 1, pp. 668-671.
 41. H. Bernard, L. Mondoulet, M. F. Drumare, E. Paty, P. Scheinmann, R. Thai, J. M. Wal, Identification of a new natural Ara h 6 isoform and of its proteolytic product as major allergens in peanut, *J. Agr. Food Chem.*, 2007, Vol. 55, pp. 9663-9669.
 42. S. J. Koppelman, C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, M. Helsing, H. H. J. de Jongh, Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties, *J. Biol. Chem.*, 1999, Vol. 274, pp. 4770-4777.
 43. S. J. Koppelman, S. L. Hefle, S. L. Taylor, G. A. H. de Jong, Digestion of peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, and Ara h 6: A comparative in vitro study and partial characterization of digestion-resistant peptides, *Mol. Nut. Food Res.*, 2010, Vol. 54, pp. 1711-1721.
 44. D. S. Shin, C. M. Compadre, S. J. Maleki, R. A. Kopper, H. Sampson, S. K. Huang, A. W. Burks, G. A. Bannon, Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h1, an abundant and highly allergenic peanut protein, *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, pp. 13753-13759.
 45. M. Sen, R. Kopper, L. Pons, E. C. Abraham, A. W. Burks, G. A. Bannon, Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes, *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, pp. 882-887.
 46. A. W. Burks, G. Cockrell, J. S. Stanley, R. M. Helm, G. A. Bannon, Isolation, Identification, and Characterization of Clones Encoding Antigens Responsible for Peanut Hypersensitivity, *Int. Arch. Allergy Imm.*, 1995, Vol. 107, pp. 248-250.
 47. S. J. Koppelman, E. F. Knol, R. A. A. Vlooswijk, M. Wensing, A. C. Knulst, S. L. Hefle, H. Gruppen, S. Piersma, Peanut allergen Ara h 3: Isolation from peanuts and biochemical characterization, *Allergy*, 2003, Vol. 58, pp. 1144-1151.
 48. P. Rabjohn, E. M. Helm, J. S. Stanley, C. M. West, H. A. Sampson, A. W. Burks, G. A. Bannon, Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3, *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 103, pp. 535-542.

49. A. Asaranoj, S. Glaumann, L. Elfstrom, G. Lilja, J. Lidholm, C. Nilsson, M. Wickman, Anaphylaxis to Peanut in a Patient Predominantly Sensitized to Ara h 6, *Int. Arch. Allergy Imm.*, 2012, Vol. 159, pp. 209-212.
50. A. E. Koid, M. D. Chapman, R. G. Hamilton, R. van Ree, S. A. Versteeg, S. C. Dreskin, S. J. Koppelman, S. Wunschmann, Ara h 6 Complements Ara h 2 as an Important Marker for IgE Reactivity to Peanut, *J. Agr. Food Chem.*, 2014, Vol. 62, pp. 206-213.
51. L. Mondoulet, E. Paty, M. F. Drumare, S. Ah-Leung, P. Scheinmann, R. M. Willemot, J. M. Wal, H. Bernard, Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins, *J. Agr. Food Chem.*, 2005, Vol. 53, pp. 4547-4553.
52. P. Singh, R. Kumar, S. N. Sabapathy, A. S. Bawa, Functional and edible uses of soy protein products, *Compr. Rev. Food Sci. F*, 2008, Vol. 7, pp. 14-28.
53. T. Cucu, B. Devreese, B. Kerkaert, M. Rogge, L. Vercruyssen, and B. De Meulenaer, ELISA-Based Detection of Soybean Proteins: A Comparative Study Using Antibodies Against Modified and Native Proteins, *Food Anal Method*, 2012, Vol. 5, pp. 1121-1130.
54. B. G. Hammond, J. M. Jez, Impact of food processing on the safety assessment for proteins introduced into biotechnology-derived soybean and corn crops, *Food Chem. Toxicol*, 2011, Vol. 49, pp. 711-721.
55. A. K. Verma, S. Kumar, M. Das, P. D. Dwivedi, A Comprehensive Review of Legume Allergy, *Clin. Rev. Allerg. Immunol.*, 2013, Vol. 45, pp. 30-46.
56. S. Kreijkamp-Kaspers, L. Kok, D. E. Grobbee, E. H. F. de Haan, A. Aleman, J. W. Lampe, Y. T. van der Schouw, Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women - A randomized controlled trial, *Jama-J. Am. Med. Assoc.*, 2004, Vol. 292, pp. 65-74.
57. M. Friedman, D. L. Brandon, Nutritional and health benefits of soy proteins, *J. Ag. Food Chem.*, 2001, Vol. 49, pp. 1069-1086.
58. S. Wilson, K. Blaschek, E. G. de Mejia, Allergenic proteins in soybean: Processing and reduction of P34 allergenicity, *Nutr. Rev.*, 2005, Vol. 63, pp. 47-58.
59. L. L'Hocine, J. I. Boye, Allergenicity of soybean: New developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies, *Crit. Rev. Food Sci.i*, 2007, Vol. 47, pp. 127-143.
60. S. H. Sicherer, H. A. Sampson, A. W. Burks, Peanut and soy allergy: a clinical and therapeutic dilemma, *Allergy*, 2000, Vol. 55, pp. 515-521.

61. N. C. Nielsen, C. D. Dickinson, T. J. Cho, V. H. Thanh, B. J. Scallan, R. L. Fischer, T. L. Sims, G. N. Drews, R. B. Goldberg, Characterization of the Glycinin Gene Family in Soybean, *Plant Cell*, 1989, Vol. 1, pp. 313-328.
62. N. Maruyama, T. Fukuda, S. Saka, N. Inui, J. Kotoh, M. Miyagawa, M. Hayashi, M. Sawada, T. Moriyama, S. Utsumi, Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins, *Phytochemistry*, 2003, Vol. 64, pp. 701-708.
63. H. B. Krishnan, W. S. Kim, S. Jang, M. S. Kerley, All Three Subunits of Soybean beta-Conglycinin Are Potential Food Allergens, *J. Agr. Food Chem.*, 2009, Vol. 57, pp. 938-943.
64. T. Holzhauser, O. Wackermann, B. K. Ballmer-Weber, C. Bindslev-Jensen, J. Scibilia, L. Perono-Garoffo, S. Utsumi, L. K. Poulsen, S. Vieths, Soybean (Glycine max) allergy in Europe: Gly m 5 (beta-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy, *J. Allergy Clin. Immun.*, 2009, Vol. 123, pp. 452-458.
65. R. M. Helm, G. Cockrell, C. Connaughton, H. A. Sampson, G. A. Bannon, V. Beilinson, D. Livingstone, N. C. Nielsen, A. W. Burks, A soybean G2 glycinin allergen - 1. Identification and characterization, *Int. Arch. Allergy Imm.*, 2000, Vol. 123, pp. 205-212.
66. D. N. Crowell, M. E. John, D. Russell, R. M. Amasino, Characterization of a Stress-Induced, Developmentally Regulated Gene Family from Soybean, *Plant Mol. Biol.*, 1992, Vol. 18, pp. 459-466.
67. K. Thomas, C. Herouet-Guicheney, G. Ladics, G. Bannon, A. Cockburn, R. Crevel, J. Fitzpatrick, C. Mills, L. Privalle, S. Vieths, Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report, *Food Chem. Toxicol.*, 2007, Vol. 45, pp. 1116-1122.
68. A. Paschke, M. Besler, Stability of bovine allergens during food processing, *Ann. Allerg. Asthma Im.*, 2002, Vol. 89, pp. 16-20.
69. J. H. Savage, A. J. Kaeding, E. C. Matsui, R. A. Wood, The natural history of soy allergy, *J. Allergy Clin. Immun.*, 2010, Vol. 125, pp. 683-686.
70. J. P. Schofield (ed.), *Wheat Structure, Biochemistry, and Functionality*, Royal Society of Chemistry, 1995.
71. P. R. Shewry, A. S. Tatham, J. Forde, M. Kreis, B. J. Mifflin, The Classification and Nomenclature of Wheat Gluten Proteins - a Reassessment, *J. Cereal Sci.*, 1986, Vol. 4, pp. 97-106.
72. H. Wieser, Chemistry of gluten proteins, *Food Microbiol.*, 2007, Vol. 24, pp. 115-119.

73. W. H. Cook, R. C. Rose, Solubility of gluten, *Nature*, 1934, Vol. 134, pp. 380-381.
74. H. Wieser, G. Zimmermann, Importance of amounts and proportions of high molecular weight subunits of glutenin for wheat quality, *Eur. Food Res. Technol.*, 2000, Vol. 210, pp. 324-330.
75. P. R. Shewry, N. G. Halford, P. S. Belton, A. S. Tatham, The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2002, Vol. 357, pp. 133-142.
76. H. Wieser, P. Koehler, The biochemical basis of celiac disease, *Cereal Chem.*, 2008, Vol. 85, pp. 1-13.
77. H. Wieser, R. Kieffer, Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale, *J. Cereal Sci.*, 2001, Vol. 34, pp. 19-27.
78. S. B. Altenbach, K. M. Kothari, Omega gliadin genes expressed in *Triticum aestivum* cv. Butte 86: Effects of post-anthesis fertilizer on transcript accumulation during grain development, *J. Cereal Sci.*, 2007, Vol. 46, pp. 169-177.
79. N. Inomata, Wheat allergy, *Curr. Opin. Allergy Cl.*, 2009, Vol. 9, pp. 238-243.
80. J. M. James, J. P. Sixbey, R. M. Helm, G. A. Bannon, A. W. Burks, Wheat alpha-amylase inhibitor: A second route of allergic sensitization, *J. Allergy Clin. Immun.*, 1997, Vol. 99, pp. 239-244.
81. D. Mittag, B. Niggemann, I. Sander, I. Reese, E. M. Fiedler, M. Worm, S. Vieths, G. Reese, Immunoglobulin E-reactivity of wheat-allergic subjects (baker's asthma, food allergy, wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis) to wheat protein fractions with different solubility and digestibility, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2004, Vol. 48, pp. 380-389.
82. C. Hischenhuber, R. Crevel, B. Jarry, M. Maki, D. A. Moneret-Vautrin, A. Romano, R. Troncone, R. Ward, Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease, *Aliment. Pharm. Therap.*, 2006, Vol. 23, pp. 559-575.
83. F. Hausch, L. Shan, N. A. Santiago, G. M. Gray, C. Khosla, Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides, *Am. J. Physiol-Gastr. L*, 2002, Vol. 283, pp. G996-G1003.
84. F. Biagi, O. Luinetti, J. Campanella, C. Klersy, C. Zambelli, V. Villanacci, A. Lanzini, G. R. Corazza, Intraepithelial lymphocytes in the villous tip: do they indicate potential coeliac disease?, *J. Clin. Pathol.*, 2004, Vol. 57, pp. 835-839.

85. L. W. Vader, A. de Ru, Y. van der Wal, Y. M. C. Kooy, W. Benckhuijsen, M. L. Mearin, J. W. Drijfhout, P. van Veelen, F. Koning, Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease, *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, pp. 643-649.
86. M. Bodd, M. Raki, S. Tollefsen, L. E. Fallang, E. Bergseng, K. E. A. Lundin, L. M. Sollid, HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22, *Mucosal Immunol.*, 2010, Vol. 3, pp. 594-601.
87. L. M. Sollid, O. Molberg, S. McAdam, K. E. A. Lundin, Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase - guilty by association?, *Gut*, 1997, Vol. 41, pp. 851-852.
88. S. M. Gendel, The Regulatory Challenge of Food Allergens, *J. Agr. Food Chem.*, 2013, Vol. 61, pp. 5634-5637.
89. S. L. Taylor, S. L. Hefle, Allergen control, *Food Technol.-Chicago*, 2005, Vol. 59, pp. 40-43.
90. R. C. Alves, M. F. Barroso, M. B. Gonzalez-Garcia, M. B. P. P. Oliveira, C. Delerue-Matos, New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies, *Crit. Rev. Food Sci.*, 2016, Vol. 56, pp. 2304-2319.
91. R. T. Jones, D. L. Squillace, J. W. Yunginger, Anaphylaxis in a Milk-Allergic Child after Ingestion of Milk-Contaminated Kosher-Pareve-Labeled Dairy-Free Dessert, *Ann. Allergy*, 1992, Vol. 68, pp. 223-227.
92. N. Laoprasert, N. D. Wallen, R. T. Jones, S. L. Hefle, S. L. Taylor, J. W. Yunginger, Anaphylaxis in a milk-allergic child following ingestion of lemon sorbet containing trace quantities of milk, *J. Food Protect.*, 1998, Vol. 61, pp. 1522-1524.
93. J. W. Yunginger, M. B. Gauerke, R. T. Jones, M. J. E. Dahlberg, S. J. Ackerman, Use of Radioimmunoassay to Determine the Nature, Quantity and Source of Allergenic Contamination of Sunflower Butter, *J. Food Protect.*, 1983, Vol. 46, pp. 625-628.
94. N. Memisi, S. V. Moracani, M. Miliasevic, J. Babic, D. Djukic, CIP cleaning processes in the dairy industry, *Procedia Food Sciences*, 2015, Vol. 5, pp. 184-186.
95. C. Cordle, Allergen quality assurance for high hypoallergenic formula in *Detecting allergens in food*, edited by S.J.Coppelman and S.L.Hefle (Woodhead Publishing Cambridge, 2006), pp. 293-314.
96. T. Cucu, L. Jacxsens, B. De Meulenaer, Analysis To Support Allergen Risk Management: Which Way To Go?, *J. Agr. Food Chem.*, 2013, Vol. 61, pp. 5624-5633.

97. R. E. Poms, C. L. Klein, E. Anklam, Methods for allergen analysis in food: a review, *Food Addit. Contam.*, 2004, Vol. 21, pp. 1-31.
98. T. Holzhauser, L. I. Dehne, A. Hoffmann, D. Haustein, S. Vieths, Rocket immunoelectrophoresis (RIE) for determination of potentially allergenic peanut proteins in processed foods as a simple means for quality assurance and food safety, *European Food Research and Technology*, 1998, Vol. 206, pp. 1-8.
99. I. Malmheden Yman, A. Eriksson, J. Everitt, L. Yman, T. Karlsson, Analysis of food proteins for verification of contamination or mislabeling., *Food and Agricultural Immunology*, 1994, Vol. 6, pp. 167-172.
100. G. F. Schappi, V. Konrad, D. Imhof, R. Etter, B. Wuthrich, Hidden peanut allergens detected in various foods: findings and legal measures, *Allergy*, 2001, Vol. 56, pp. 1216-1220.
101. B. Scheibe, W. Weiss, F. Rueff, B. Przybilla, A. Gorg, Detection of trace amounts of hidden allergens: hazelnut and almond proteins in chocolate, *J. Chromatogr. B*, 2001, Vol. 756, pp. 229-237.
102. C. Pallen, C. Friry-Santini, C. Herouet-Guicheney, A. Capt, Technical variability of 2D gell electrophoresis-Application to soybean allergens, *Toxicology Reports*, 2014, Vol. 1, pp. 734-742.
103. J. Heick, M. Fischer, B. Popping, First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2011, Vol. 1218, pp. 938-943.
104. A. W. Burks, L. W. Williams, R. M. Helm, C. Connaughton, G. Cockrell, T. Obrien, Identification of a Major Peanut Allergen, Ara-H-I, in Patients with Atopic-Dermatitis and Positive Peanut Challenges, *J. Allergy Clin. Immun.*, 1991, Vol. 88, pp. 172-179.
105. E. A. Pastorello, C. Trambaioli, Isolation of food allergens, *J. Chromatogr. B*, 2001, Vol. 756, pp. 71-84.
106. H. Singh, M. J. Cantoria, P. Malave, D. Saputra, and S. Maleki, Standardization of RP-HPLC methods for the detection of the major peanut allergens Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3, *Food Chem.*, 2016, Vol. 194, pp. 383-390.
107. S. H. Ashoor, P. G. Stiles, Determination of Soy Protein, Whey-Protein, and Casein in Unheated Meats by High-Performance Liquid-Chromatography, *J. Chromatogr.*, 1987, Vol. 393, pp. 321-328.
108. J. A. Bietz, T. Burnouf, L. A. Cobb, J. S. Wall, Gliadin Analysis by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography - Optimization of Extraction Conditions, *Cereal Chem.*, 1984, Vol. 61, pp. 124-129.

109. G. Moatsou, M. Samolada, A. Katsabeki, E. Anifantakis, Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds, *Lait*, 2004, Vol. 84, pp. 285-296.
110. A. C. A. Veloso, N. Teixeira, I. M. P. L. V. O. Ferreira, Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis - Detection of milk adulterations, *J. Chromatog.r A*, 2002, Vol. 967, pp. 209-218.
111. I. M. P. L. V. O. Ferreira, H. Cacote, Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins, *J. Chromatogr. A*, 2003, Vol. 1015, pp. 111-118.
112. N. Z. Ballin, Estimation of whey protein in casein coprecipitate and milk powder by high-performance liquid chromatography quantification of cysteine, *J. Agr. Food Chem.*, 2006, Vol. 54, pp. 4131-4135.
113. X. J. Ding, Y. Y. Yang, S. Zhao, Y. Li, Z. Wang, Analysis of alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin A and B in whey protein powder, colostrum, raw milk, and infant formula by CE and LC, *Dairy Sci. Technol.*, 2011, Vol. 91, pp. 213-225.
114. M. Koeberl, D. Clarke, A. L. Lopata, Next Generation of Food Allergen Quantification Using Mass Spectrometric Systems, *J. Proteome Res.*, 2014, Vol. 13, pp. 3499-3509.
115. S. Kirsch, S. Fourdrilis, R. Dobson, M. L. Scippo, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, Quantitative methods for food allergens: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, Vol. 395, pp. 57-67.
116. C. Czerwenka, I. Maier, N. Potocnik, F. Pittner, W. Lindner, Absolute quantitation of beta-lactoglobulin by protein liquid chromatography - Mass spectrometry and its application to different milk products, *Anal. Chem.*, 2007, Vol. 79, pp. 5165-5172.
117. Y. P. Ren, Z. Han, X. J. Chu, J. S. Zhang, Z. X. Cai, Y. J. Wu, Simultaneous determination of bovine alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in infant formulae by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 2010, Vol. 667, pp. 96-102.
118. R. K. Chen, L. W. Chang, Y. Y. Chung, M. H. Lee, Y. C. Ling, Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Sp.*, 2004, Vol. 18, pp. 1167-1171.
119. L. Monaci, A. Visconti, Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens, *TrAC-Trend Anal Chem*, 2009, Vol. 28, pp. 581-591.
120. K. J. Shefcheck, J. H. Callahan, S. M. Musser, Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem

- mass spectrometry (LC-MS/MS), *J. Agr. Food Chem.*, 2006, Vol. 54, pp. 7953-7959.
121. D. Weber, P. Raymond, S. Ben-Rejeb, B. Lau, Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method using capillary liquid chromatography and nanoelectrospray ionization-quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer for the detection of milk allergens, *J. Agr. Food Chem.*, 2006, Vol. 54, pp. 1604-1610.
 122. H. Chassaigne, M. Brohee, J. V. Norgaard, A. J. van Hengel, Investigation on sequential extraction of peanut allergens for subsequent analysis by ELISA and 2D gel electrophoresis, *Food Chem.*, 2007, Vol. 105, pp. 1671-1681.
 123. L. Monaci, A. J. van Hengel, Development of a method for the quantification of whey allergen traces in mixed-fruit juices based on liquid chromatography with mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, 2008, Vol. 1192, pp. 113-120.
 124. N. Bernardi, G. Benetti, N. M. Haouett, M. Sergi, L. Grotta, S. Marchetti, F. Castellani, G. Martino, A rapid high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for unambiguous detection of different milk species employed in cheese manufacturing, *J. Dairy Sci.*, 2015, Vol. 98, pp. 8405-8413.
 125. C. Bignardi, L. Elviri, A. Penna, M. Careri, A. Mangia, Particle-packed column versus silica-based monolithic column for liquid chromatography-electrospray-linear ion trap-tandem mass spectrometry multiallergen trace analysis in foods, *J. Chromatogr. A*, 2010, Vol. 1217, pp. 7579-7585.
 126. R. Schuhmacher, M. Sulyok, R. Krska, Recent developments in the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of organic residues and contaminants, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, Vol. 390, pp. 253-256.
 127. A. Demmel, C. Hupfer, E. I. Hampe, U. Busch, K. H. Engel, Development of a real-time PCR for the detection of lupine DNA (*Lupinus* species) in foods, *J. Agr. Food Chem.*, 2008, Vol. 56, pp. 4328-4332.
 128. L. Monaci, A. Visconti, Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives, *Trends Food Sci. Tech.*, 2010, Vol. 21, pp. 272-283.
 129. R. E. Poms, E. Anklam, M. Kuhn, Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection, *J. AOAC Int.*, 2004, Vol. 87, pp. 1391-1397.
 130. A. M. G. Galan, M. Brohee, E. D. Silva, A. J. van Hengel, H. Chassaigne, Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial DNA as markers for the presence of allergens in processed food, *Food Chem.*, 2011, Vol. 127, pp. 834-841.

131. R. Koppel, F. van Velsen-Zimmerli, T. Bucher, Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food, *Eur. Food Res. Technol.*, 2012, Vol. 235, pp. 843-852.
132. S. L. Mustorp, S. M. Dromtorp, A. L. Holck, Multiplex, Quantitative, Ligation-Dependent Probe Amplification for Determination of Allergens in Food, *J. Ag. Food Chem.*, 2011, Vol. 59, pp. 5231-5239.
133. L. A. Tortajada-Genaro, S. Santiago-Felipe, S. Morais, J. A. Gabaldon, R. Puchades, A. Maquieira, Multiplex DNA Detection of Food Allergens on a Digital Versatile Disk, *J. Agr. Food Chem.*, 2012, Vol. 60, pp. 36-43.
134. E. Scaravelli, M. Brohee, R. Marchelli, A. J. van Hengel, The effect of heat treatment on the detection of peanut allergens as determined by ELISA and real-time PCR, *Anal. Bioanal. Chem*, 2009, Vol. 395, pp. 127-137.
135. Μ.Α. Κουππάρης, Ειδικά Κεφάλαια Αναλυτικής Χημείας, Αθήνα 1989.
136. Θ. Π. Χατζηιωάννου, Μ. Α. Κουππάρης, Ενόργανη Ανάλυση, Αθήνα 2000.
137. R. E. Poms, M. E. Agazzi, A. Bau, M. Brohee, C. Capelletti, J. V. Norgaard, E. Anklam, Inter-laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate, *Food Addi. Contam.*, 2005, Vol. 22, pp. 104-112.
138. T. Holzhauser, S. Vieths, Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein in complex food matrices, *J. Agr. Food Chem.*, 1999, Vol. 47, pp. 603-611.
139. O. Stephan, S. Vieths, 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. Agr. Food Chem.*, 2004, Vol. 52, pp. 3754-3760.
140. L. L'Hocine, J. I. Boye, C. Munyana, Detection and quantification of soy allergens in food: Study of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays, *J. Food Sci.*, 2007, Vol. 72, pp. C145-C153.
141. J. S. Chen, J. Wang, P. X. Song, X. Ma, Determination of glycinin in soybean and soybean products using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, *Food Chem.*, 2014, Vol. 162, pp. 27-33.
142. B. Liu, D. Teng, Y. L. Yang, X. M. Wang, J. H. Wang, Development of a competitive ELISA for the detection of soybean alpha subunit of beta-conglycinin, *Process Biochem.*, 2012, Vol. 47, pp. 280-287.
143. Codex Alimentarius Commission, ALINORM, 06/29/23, 2006.

144. M. C. Mena, M. Lombardia, A. Hernando, E. Mendez, J. P. Albar, Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody, *Talanta*, 2012, Vol. 91, pp. 33-40.
145. R. Haraszi, H. Chassaigne, A. Maquet, F. Ulberth, Analytical Methods for Detection of Gluten in Food-Method Developments in Support of Food Labeling Legislation, *J. AOAC Int.*, 2011, Vol. 94, pp. 1006-1025.
146. W. Richter, I. Krause, C. Graf, I. Sperrer, C. Schwarzer, H. Klostermeyer, An indirect competitive ELISA for the detection of cows' milk and caseinate in goats' and ewes' milk and cheese using polyclonal antibodies against bovine gamma-caseins, *Z. Lebensm. Unters F A*, 1997, Vol. 204, pp. 21-26.
147. H. X. Song, H. Y. Xue, Y. Han, Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay, *Food Control*, 2011, Vol. 22, pp. 883-887.
148. I. P. Hurley, R. C. Coleman, H. E. Ireland, J. H. H. Williams, Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese, *Int. Dairy J.*, 2006, Vol. 16, pp. 805-812.
149. M. G. E. G. Bremer, A. E. M. Kemmers-Voncken, E. A. M. Boers, R. Frankhuizen, W. Haasnoot, Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder, *Int. Dairy J.*, 2008, Vol. 18, pp. 294-302.
150. M. Roder, S. Vieths, T. Holzhauser, Commercial lateral flow devices for rapid detection of peanut (*Arachis hypogaea*) and hazelnut (*Corylus avellana*) cross-contamination in the industrial production of cookies, *Anal Bioanal Chem*, 2009, Vol. 395, pp. 103-109.
151. O. Stephan, N. Moller, S. Lehmann, T. Holzhauser, and S. Vieths, Development and validation of two dipstick type immunoassays for determination of trace amounts of peanut and hazelnut in processed foods, *Eur. Food Res. Technol.* 2002, Vol. 215, pp. 431-436.
152. P. Schubert-Ullrich, J. Rudolf, P. Ansari, B. Galler, M. Fuhrer, A. Molinelli, S. Baumgartner, Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, Vol. 395, pp. 69-81.
153. H. Nakamura, I. Karube, Current research activity in biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, Vol. 377, pp. 446-468.
154. P. S. Petrou, D. Ricklin, M. Zavali, I. Raptis, S. E. Kakabakos, K. Misiakos, J. D. Lambris, Real-time label-free detection of complement activation products in human serum by white light reflectance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, Vol. 24, pp. 3359-3364.

155. A. F. Collings, F. Caruso, Biosensors: recent advances, *Rep. Prog. Phys.*, 1997, Vol. 60, pp. 1397-1445.
156. D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, Vol. 16, pp. 121-131.
157. P. D'Orazio, Biosensors in clinical chemistry, *Clin. Chim. Acta*, 2003, Vol. 334, pp. 41-69.
158. R. Pilolli, L. Monaci, A. Visconti, Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management, *TRAC-Trend Anal. Chem.*, 2013, Vol. 47, pp. 12-26.
159. S. Viswanathan, H. Radecka, J. Radecki, Electrochemical biosensors for food analysis, *Monatsh. Chem.*, 2009, Vol. 140, pp. 891-899.
160. M. Diaz-Gonzalez, M. B. Gonzalez-Garcia, A. Costa-Garcia, Recent advances in electrochemical enzyme immunoassays, *Electroanal.*, 2005, Vol. 17, pp. 1901-1918.
161. C. Milligan, A. Ghindilis, Laccase based sandwich scheme immunosensor employing mediatorless electrocatalysis, *Electroanal.*, 2002, Vol. 14, pp. 415-419.
162. N. F. Starodub, B. B. Dzantiev, V. M. Starodub, A. V. Zherdev, Immunosensor for the determination of the herbicide simazine based on an ion-selective field-effect transistor, *Anal. Chim. Acta*, 2000, Vol. 424, pp. 37-43.
163. K. Yamanaka, M. C. Vestergaard, E. Tamiya, Printable Electrochemical Biosensors: A Focus on Screen-Printed Electrodes and Their Application, *Sensors-Basel*, 2016, Vol. 16, pp. 1761-1777.
164. J. Zeravik, T. Ruzgas, M. Franek, A highly sensitive flow-through amperometric immunosensor based on the peroxidase chip and enzyme-channeling principle, *Biosens. Bioelectron.*, 2003, Vol. 18, pp. 1321-1327.
165. I. Cesarino, F. C. Moraes, M. R. V. Lanza, S. A. S. Machado, Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes, *Food Chem.*, 2012, Vol. 135, pp. 873-879.
166. Q. Cao, H. Zhao, Y. M. Yang, Y. J. He, N. Ding, J. Wang, Z. J. Wu, K. X. Xiang, G. W. Wang, Electrochemical immunosensor for casein based on gold nanoparticles and poly(L-Arginine)/multi-walled carbon nanotubes composite film functionalized interface, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, Vol. 26, pp. 3469-3474.
167. T. Laube, S. V. Kergaravat, S. N. Fabiano, S. R. Hernandez, S. Alegret, M. I. Pividori, Magneto immunosensor for gliadin detection in gluten-free foodstuff:

- Towards food safety for celiac patients, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, Vol. 27, pp. 46-52.
168. R. C. Alves, F. B. Pimentel, H. P. A. Nouws, R. C. B. Marques, M. B. Gonzalez-Garcia, M. B. P. P. Oliveira, C. Delerue-Matos, Detection of Ara h 1 (a major peanut allergen) in food using an electrochemical gold nanoparticle-coated screen-printed immunosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 2015, Vol. 64, pp. 19-24.
169. R. C. Alves, F. B. Pimentel, H. P. A. Nouws, W. Correr, M. B. Gonzalez-Garcia, M. B. P. P. Oliveira, C. Delerue-Matos, Detection of the peanut allergen Ara h 6 in foodstuffs using a voltammetric biosensing approach, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, Vol. 407, pp. 7157-7163.
170. M. S. Chiriaco, F. de Feo, E. Primiceri, A. G. Monteduro, G. E. de Benedetto, A. Pennetta, R. Rinaldi, and G. Maruccio, Portable gliadin-immunochip for contamination control on the food production chain, *Talanta*, 2015, Vol. 142, pp. 57-63.
171. V. R. V. Montiel, R. M. Torrente-Rodriguez, S. Campuzano, A. Pellicano, A. J. Reviejo, M. S. Cosio, J. M. Pingarron, Simultaneous Determination of the Main Peanut Allergens in Foods Using Disposable Amperometric Magnetic Beads-Based Immunosensing Platforms, *Chemosensors*, 2016, Vol. 4, pp. 11-25.
172. C. Kokkinos, M. Angelopoulou, A. Economou, M. Prodromidis, A. Florou, W. Haasnoot, P. Petrou, S. Kakabakos, Lab-on-a-Membrane Foldable Devices for Duplex Drop-Volume Electrochemical Biosensing Using Quantum Dot Tags, *Anal. Chem.*, 2016, Vol. 88, pp. 6897-6904.
173. J. E. Roederer, G. J. Bastiaans, Microgravimetric Immunoassay with Piezoelectric-Crystals, *Anal. Chem.*, 1983, Vol. 55, pp. 2333-2336.
174. M. Thompson, C. L. Arthur, G. K. Dhaliwal, Liquid-Phase Piezoelectric and Acoustic Transmission Studies of Interfacial Immunochemistry, *Anal. Chem.*, 1986, Vol. 58, pp. 1206-1209.
175. R. L. Bunde, E. J. Jarvi, J. J. Rosentreter, Piezoelectric quartz crystal biosensors, *Talanta*, 1998, Vol. 46, pp. 1223-1236.
176. A. Janshoff, H. J. Galla, and C. Steinem, Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors?, *Angew. Chem. Int. Edi.*, 2000, Vol. 39, pp. 4004-4032.
177. P. T. Chu, C. S. Lin, W. J. Chen, C. F. Chen, H. W. Wen, Detection of Gliadin in Foods Using a Quartz Crystal Microbalance Biosensor That Incorporates Gold Nanoparticles, *J. Agr. Food Chem.*, 2012, Vol. 60, pp. 6483-6492.

178. R. Funari, I. Terracciano, B. Della Ventura, S. Ricci, T. Cardi, N. D'Agostino, R. Velotta, Label-Free Detection of Gliadin in Food by Quartz Crystal Microbalance-Based Immunosensor, *J. Agr. Food Chem.*, 2017, Vol. 65, pp. 1281-1289.
179. S. P. Sakti, N. Chabibah, S. P. Ayu, M. C. Padaga, A. Aulanni'am, Development of QCM Biosensor with Specific Cow Milk Protein Antibody for Candidate Milk Adulteration Detection, *J. Sensors*, 2016. DOI 1807610.1801155/1802016/1807647.
180. X. D. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Y. Zhu, J. D. Suter, Y. Z. Sun, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, *Anal. Chim. Acta*, 2008, Vol. 620, pp. 8-26.
181. R. A. Potyrailo, S. E. Hobbs, G. M. Hieftje, Optical waveguide sensors in analytical chemistry: today's instrumentation, applications and trends for future development, *Fresen J. Anal. Chem.*, 1998, Vol. 362, pp. 349-373.
182. L. Polerecki, J. Hamrle, B. D. MacCraith, Theory of the radiation of dipoles placed within a multilayer system, *Appl. Optics*, 2000, Vol. 39, pp. 3968-3977.
183. C. R. Taitt, G. P. Anderson, and F. S. Ligler, Evanescent wave fluorescence biosensors, *Biosens Bioelectron*, 2005, Vol. 20, pp. 2470-2487.
184. F. S. Ligler, C. R. Taitt, Optical Biosensors present & future, 2002.
185. T. J. Kulp, I. Camins, S. M. Angel, C. Munkholm, and D. R. Walt, Polymer Immobilized Enzyme Optrodes for the Detection of Penicillin, *Anal. Chem.*, 1987, Vol. 59, pp. 2849-2853.
186. I. Biran, X. Yu, D. R. Walt, Optrode-based fiber optic biosensors (bio-optrodes), *Optical Biosensors: Today and Tomorrow (2nd Edition)*, 2008.
187. J. Czajka, C. A. Batt, A solid phase fluorescent capillary immunoassay for the detection of Escherichia coli O157:H7 in ground beef and apple cider, *J. Appl. Bacteriol.*, 1996, Vol. 81, pp. 601-607.
188. S. P. Huth, P. S. Warholic, J. M. Devou, L. K. Chaney, and G. H. Clark, Parallax (TM) beta-lactam: A capillary-based fluorescent immunoassay for the determination of penicillin-G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, cephapirin, and ceftiofur in bovine milk, *J. AOAC Int.*, 2002, Vol. 85, pp. 355-364.
189. S. H. Sheikh, B. A. Abela, A. Mulchandani, Development of a fluorescence immunoassay for measurement of paclitaxel in human plasma, *Anal. Biochem.*, 2000, Vol. 283, pp. 33-38.
190. C. Mastichiadis, S. E. Kakabakos, I. Christofidis, M. A. Koupparis, C. Willetts, K. Misiakos, Simultaneous determination of pesticides using a four-band disposable optical capillary immunosensor, *Anal. Chem.*, 2002, Vol. 74, pp. 6064-6072.

191. P. S. Petrou, S. E. Kakabakos, I. Christofidis, P. Argitis, K. Misiakos, Multi-analyte capillary immunosensor for the determination of hormones in human serum samples, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, Vol. 17, pp. 261-268.
192. A. Ramachandran, S. Wang, J. Clarke, S. J. Ja, D. Goad, L. Wald, E. M. Flood, E. Knobbe, J. V. Hryniewicz, S. T. Chu, D. Gill, W. Chen, O. King, B. E. Little, A universal biosensing platform based on optical micro-ring resonators, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, Vol. 23, pp. 939-944.
193. R. Dekker, N. Usechak, M. Forst, A. Driessen, Ultrafast nonlinear all-optical processes in silicon-on-insulator waveguides, *J. Phy. D Appl. Phy.*, 2007, Vol. 40, pp. R249-R271.
194. A. L. Washburn, L. C. Gunn, R. C. Bailey, Label-Free Quantitation of a Cancer Biomarker in Complex Media Using Silicon Photonic Microring Resonators, *Anal. Chem.*, 2009, Vol. 81, pp. 9499-9506.
195. A. L. Washburn, M. S. Luchansky, A. L. Bowman, R. C. Bailey, Quantitative, Label-Free Detection of Five Protein Biomarkers Using Multiplexed Arrays of Silicon Photonic Microring Resonators, *Anal. Chem.*, 2010, Vol. 82, pp. 69-72.
196. W. Lukosz, Principles and Sensitivities of Integrated Optical and Surface-Plasmon Sensors for Direct Affinity Sensing and Immunosensing, *Biosens. Bioelectron.*, 1991, Vol. 6, pp. 215-225.
197. J. Homola, M. Pilaric, Surface plasmon resonance based sensors, *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors* Vol. 4, 2005.
198. J. Homola, H. Vaisocherova, J. Dostalek, M. Piliarik, Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing, *Methods*, 2005, Vol. 37, pp. 26-36.
199. B. D. Gupta, R. K. Verma, Surface Plasmon Resonance-Based Fiber Optic Sensors: Principle, Probe Designs, and Some Applications, *J. Sensors*, 2009, Vol. Article ID 979761, pp. DOI: 10.1155/2009/979761.
200. A. Suzuki, J. Kondoh, Y. Matsui, S. Shiokawa, K. Suzuki, Development of novel optical waveguide surface plasmon resonance (SPR) sensor with dual light emitting diodes, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 2005, Vol. 106, pp. 383-387.
201. C. Boozer, G. Kim, S. X. Cong, H. W. Guan, T. Londergan, Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies, *Curr. Opin. Biotech.*, 2006, Vol. 17, pp. 400-405.
202. D. K. Kim, K. Kerman, M. Saito, R. R. Sathuluri, T. Endo, S. Yamamura, Y. S. Kwon, E. Tamiya, Label-free DNA biosensor based on localized surface plasmon resonance coupled with interferometry, *Anal. Chem.*, 2007, Vol. 79, pp. 1855-1864.

203. S. P. Muller-Renaud, D. Dupont, P. Dulieu, Quantification of beta-casein in milk and cheese using an optical immunosensor, *J. Agr. Food Chem.*, 2004, Vol. 52, pp. 659-664.
204. J. Ashley, M. Piekarska, C. Segers, L. Trinh, T. Rodgers, R. Willey, I. E. Tothill, An SPR based sensor for allergens detection, *Biosens. Bioelectron.*, 2017, Vol. 88, pp. 109-113.
205. J. Pollet, F. Delport, K. P. F. Janssen, D. T. Tran, J. Wouters, T. Verbiest, J. Lammertyn, Fast and accurate peanut allergen detection with nanobead enhanced optical fiber SPR biosensor, *Talanta*, 2011, Vol. 83, pp. 1436-1441.
206. S. Muller-Renaud, D. Dupont, P. Dulieu, Quantification of kappa-casein in milk by an optical immunosensor, *Food Agr. Immunol.*, 2003, Vol. 15, pp. 265-277.
207. H. M. Hiep, T. Endo, K. Kerman, M. Chikae, D. K. Kim, S. Yamamura, Y. Takamura, E. Tamiya, A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk, *Sci. Technol. Adv. Mat.*, 2007, Vol. 8, pp. 331-338.
208. W. Haasnoot, G. R. Marchesini, K. Koopal, Spreeta-based biosensor immunoassays to detect fraudulent adulteration in milk and milk powder, *J. AOAC Int.*, 2006, Vol. 89, pp. 849-855.
209. W. Haasnoot, N. G. E. Smits, A. E. M. Kemmers-Voncken, M. G. E. G. Bremer, Fast biosensor immunoassays for the detection of cows' milk in the milk of ewes and goats, *J. Dairy Res.*, 2004, Vol. 71, pp. 322-329.
210. W. Haasnoot, K. Olieman, G. Cazemier, R. Verheijen, Direct biosensor immunoassays for the detection of nonmilk proteins in milk powder, *J. Agr. Food Chem.*, 2001, Vol. 49, pp. 5201-5206.
211. S. R. Raz, H. Liu, W. Norde, M. G. E. G. Bremer, Food Allergens Profiling with an Imaging Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor, *Anal. Chem.*, 2010, Vol. 82, pp. 8485-8491.
212. D. P. Campbell, C. J. McMloskey, Interferometric Biosensors in Optical Biosensors: Present and Future, *Chapter 9*, Elsevier, 2002.
213. T. Young, The Bakerian lecture: Experiments and calculations relative to physical optics, *Fil. Trans. R. Soc. London*, 1804, Vol. 94, pp. 1-16.
214. P. Kozma, F. Kehl, E. Ehrentreich-Forster, C. Stamm, F. F. Bier, Integrated planar optical waveguide interferometer biosensors: A comparative review, *Biosens Bioelectron.*, 2014, Vol. 58, pp. 287-307..
215. B. E. A. Saleh, M. C. Teich, Fundamentals of Photonics, *Chapter 8*, Wiley, 1991.

216. Q. Liu, X. G. Tu, K. W. Kim, J. S. Kee, Y. Shin, K. Han, Y. J. Yoon, G. Q. Lo, M. K. Park, Highly sensitive Mach-Zehnder interferometer biosensor based on silicon nitride slot waveguide, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 2013, Vol. 188, pp. 681-688.
217. A. Mathesz, S. Valkai, A. Újvárosy, B. Aekbote, O. Sipos, B. Stercz, B. Kocsis, D. Szabó, A. Dér, Integrated optical biosensor for rapid detection of bacteria, *Optofluidics, Microfluidics and Nanofluidics*, 2015, Vol. 2, pp. 14-20.
218. D. Sarkar, N. S. K. Gunda, I. Jamal, S. K. Mitra, Optical biosensors with an integrated Mach-Zehnder Interferometer for detection of *Listeria monocytogenes*, *Biomed. Microdevices*, 2014, Vol. 16, pp. 509-520.
219. E. Brynda, M. Houska, A. Brandenburg, A. Wikerstal, Optical biosensors for real-time measurement of analytes in blood plasma, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, Vol. 17, pp. 665-675.
220. A. Ymeti, J. Greve, P. V. Lambeck, T. Wink, S. W. F. M. van Hovell, T. A. M. Beumer, R. R. Wijn, R. G. Heideman, V. Subramaniam, J. S. Kanger, Fast, ultrasensitive virus detection using a young interferometer sensor, *Nano Let.*, 2007, Vol. 7, pp. 394-397.
221. A. Ymeti, J. S. Kanger, J. Greve, G. A. J. Besselink, P. V. Lambeck, R. Wijn, R. G. Heideman, Integration of microfluidics with a four-channel integrated optical Young interferometer immunosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, Vol. 20, pp. 1417-1421.
222. T. Nagel, E. Ehrentreich-Forster, M. Singh, K. Schmitt, A. Brandenburg, A. Berka, F. F. Bier, Direct detection of tuberculosis infection in blood serum using three optical label-free approaches, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 2008, Vol. 129, pp. 934-940.
223. M. Kitsara, K. Misiakos, I. Raptis, E. Makarona, Integrated optical frequency-resolved Mach-Zehnder interferometers for label-free affinity sensing, *Opt. Express*, 2010, Vol. 18, pp. 8193-8206.
224. K. Misiakos, S. E. Kakabakos, P. S. Petrou, H. H. Ruf, A monolithic silicon optoelectronic transducer as a real-time affinity biosensor, *Anal. Chem.*, 2004, Vol. 76, pp. 1366-1373.
225. K. Misiakos, I. Raptis, A. Salapatias, E. Makarona, A. Botsialas, M. Hoekman, R. Stoffer, G. Jobst, Broad-band Mach-Zehnder interferometers as high performance refractive index sensors: Theory and monolithic implementation, *Opt. Express*, 2014, Vol. 22, pp. 8856-8870.
226. E. Makarona, P. Petrou, S. Kakabakos, K. Misiakos, I. Raptis, Point-of-Need bioanalytics based on planar optical interferometry, *Biotechnol. Adv.*, 2016, Vol. 34, pp. 209-233.

227. A. Psarouli, A. Salapatas, A. Botsialas, P. S. Petrou, I. Raptis, E. Makarona, G. Jobst, K. Tukkiniemi, M. Sopanen, R. Stoffer, S. E. Kakabakos, K. Misiakos, Monolithically integrated broad-band Mach-Zehnder interferometers for highly sensitive label-free detection of biomolecules through dual polarization optics, *Sci. Rep.-Uk*, 2015, Vol. 5, pp. art. No. 17600.