



Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518-7554 print
ISSN 2518-1327 online

doi: 10.32718/nvlvet11003
<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 616:613

Validation of the method for determining the egg albumin allergen in food products by enzyme-linked immunosorbent assay

T. V. Marchenko¹, S. V. Shuliak¹, O. S. Haidei¹✉, O. M. Chechet¹, Yu. V. Dobrozhan¹, B. V. Gutyj²,
O. V. Krushelnyska²

¹State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv, Ukraine

²Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Lviv, Ukraine

Article info

Received 15.03.2023
Received in revised form
17.04.2023
Accepted 18.04.2023

State Scientific and Research
Institute of Laboratory Diagnostics
and Veterinary and Sanitary
Expertise, Donetsk Str., 30,
Kyiv, 03151, Ukraine.
Tel.: +38-067-171-15-58
E-mail: olga.gaidei@gmail.com

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.

Marchenko, T. V., Shuliak, S. V., Haidei, O. S., Chechet, O. M., Dobrozhan, Yu. V., Gutyj, B. V., & Krushelnyska, O. V. (2023). Validation of the method for determining the egg albumin allergen in food products by enzyme-linked immunosorbent assay. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 25(110), 16–19. doi: 10.32718/nvlvet11003

An egg is an ecological food product containing protein, balanced vitamins, trace elements, and essential amino acids in the correct ratio. At the same time, egg albumin is an obligate allergen with no species specificity; consuming eggs from other birds does not eliminate the risk of an allergic reaction. The development of an allergy to chicken eggs in children, manifested by exudative diathesis, is especially likely. Allergy to egg protein leads to deterioration of the quality of life and health; therefore, its detection in food products is relevant today. The article contains information on the validation of the method of determining the egg protein content in food products by the enzyme-linked immunosorbent assay method and the main parameters for assessing the suitability of this method. The quantitative determination of processed chicken egg protein in food products was validated using the Ridascreen Egg ELISA test system, R-Biopharm, based on the State Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary-Sanitary Examination. The material for the study was negative samples of the matrix and enriched samples of CRM (certified reference material cake mix). Validation of the method for the quantitative determination of processed chicken egg protein in food products was carried out by determining and evaluating the following parameters: the limit of detection, quantification, convergence, reproducibility, accuracy, and uncertainty. The ELISA method for quantitatively determining processed chicken egg protein in food products has been successfully tested and meets the requirements of EU Commission Regulation 2002/657; all validation parameters are within acceptable limits. The method is suitable for food research and recommended for testing laboratories.

Key words: allergens, enzyme immunoassay, ELISA, ovukoid, ovalbumin, ovotransferrin, lysozyme, ovuculin, IgE immunoglobulins, verification.

Валідація методу визначення алергену яєчного альбуміну в харчових продуктах методом імуноферментного аналізу

Т. В. Марченко¹, С. В. Шуляк¹, О. С. Гайдей¹✉, О. М. Чечет¹, Ю. В. Доброжан¹, Б. В. Гутий²,
О. В. Крушельницька²

¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ, Україна

²Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна

Яйце – екологічний харчовий продукт, що містить білок, збалансовані вітаміни, мікроелементи та найважливіші амінокислоти у потрібному співвідношенні. Водночас яєчний альбумін є облігатним алергеном з відсутньою видоспецифічністю, тобто споживання яєць інших птахів не усуває небезпеки алергічної реакції. Особливо вірогідний розвиток алергії на курячі яйця у дітей, яка проявляється ексудативним діатезом. Алергія на яєчний білок призводить до погіршення якості життя та здоров'я, тому виявлення його у продуктах харчування є актуальним на сьогодні. Стаття містить інформацію щодо валідації методики визначення вмісту яєчного білка в харчових продуктах методом імуноферментного аналізу та основні параметри оцінювання придатності даної методики. Валідацію методу кількісного визначення білка обробленого курячого яйця у харчових продуктах за допомогою тест-системи ІФА Ridascreen Egg, R-Biopharm проводили на базі Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Матеріалом для дослідження були негативні зразки матриці та збагачені зразки CRM (сертифікований референс-матеріал суміш для тортів). Валідація методу кількісного визначення білка обробленого курячого яйця у харчових продуктах проводилася шляхом визначення та оцінювання таких параметрів: межі детектування, межі кількісного визначення, збіжності, відтворюваності, точності та невизначеності. Методика ІФА кількісного визначення білка обробленого курячого яйця у харчових продуктах пройшла успішну апробацію та відповідає вимогам Регламенту Комісії ЄС 2002/657, всі параметри валідації перебувають у прийнятних межах. Методика є придатною для досліджень харчових продуктів і рекомендована для використання у випробувальних лабораторіях.

Ключові слова: алергени, імуноферментний аналіз, ІФА, овукоїд, овальбумін, овотрансферин, лізоцим, овуцин, імуноглобуліни IgE, верифікація.

Вступ

Харчова алергія нині є однією з найбільших проблем як серед дорослих, так і серед дітей. Друге місце серед харчових алергенів належить яєчному білку як за поширеністю, так і тяжкістю клінічних проявів та становить 0,5–2,5 % у дорослих і дітей раннього віку (Savage & Johns, 2015; Yu et al., 2016; Iweala et al., 2018; Seth et al., 2020; Peters et al., 2021).

Часто алергічні реакції виникають після вживання яєць будь-яких птахів, однак найчастіше – курячих яєць. Яєчний білок, особливо сирий, є облігатним алергеном, не є видоспецифічним, тобто заміна на яйця інших птахів не усуває небезпеки алергічної реакції. Білок курячого яйця легко проникає через слизову оболонку кишківника в незмінному вигляді. Алергічні реакції можуть розвиватися і на продукти, до складу яких входять яйця: майонез, соуси, кондитерські вироби, макаронні вироби тощо.

Велика ймовірність розвитку алергічних реакцій є при проведенні щеплень вакцинами, що містять домішки тканин курячого ембріону або різних частин плодового яйця (наприклад, щеплення проти кліщового енцефаліту, жовтої лихоманки тощо). Найчастіше у пацієнтів з алергією до курячого білка розвиваються алергічні реакції негайного типу, опосередковані антитілами IgE-типу. Алергія на курячі яйця проявляється шкірною формою (екземою, набряком Квінке), порушеннями функції дихальної системи (алергічним ринітом, бронхіальною астмою) і порушеннями з боку шлунково-кишкового тракту (кишкова диспепсія, нудота і блювота) (Caubet & Wang, 2011).

Є два види даної алергії – на курячий білок та жовток (Weatherspoon, 2017). Білок є головною алергеною фракцією яйця, він містить п'ять основних алергенів: овукоїд, овальбумін, овотрансферин, лізоцим яєчного білка і овомуцин, найважливіше значення серед яких має овальбумін – нестабільний білок, який після тривалого нагрівання – більше ніж 176 °C протягом 30 хв руйнується і не може зв'язувати імуноглобуліни IgE. Близько 70–80 % людей, що страждають алергією на яєчний білок, можуть вживати кондитерські вироби, до складу яких входять яйця. Згідно з даними вчених, у таких осіб, що регулярно споживають яйця у складі випічки, швидше розвивається

толерантність до решти яєчних алергенів. Водночас овукоїд стійкий до термічної обробки і вважається мажорним алергеном в курячому яєчному білку, хоча й становить лише 10 % вмісту останнього. Жовток також містить білки, що здатні спричинити алергічну реакцію – альфа-лівітини, проте вони слабші від алергенів білка майже на 50 %.

Яєчний білок може бути інгредієнтом харчових продуктів. Тому Регламент ЄС 1169/2011 чітко встановлює необхідність маркування на етикетках харчових продуктів вмісту яєчного білка як алергену (Rehlement Yevropeiskoho Parlamentu I Rady, 2011).

Також існує перехресна реактивність між яєчним білком від курки та індички, качки, гуски, але це не означає, що пацієнти з чутливістю до гусячого чи качиного яєць обов'язково мають алергію і на куряче яйце.

Визначення курячого білка в харчових продуктах проводять методом імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA). Враховуючи актуальність даного питання та перехресну реактивність між яєчними білками різних птахів, виникла необхідність провести валідацію методу кількісного визначення яєчного курячого білка в харчових продуктах.

Мета дослідження

Провести валідацію методу кількісного визначення білка обробленого курячого яйця у харчових продуктах з використанням тест-системи ІФА Ridascreen Egg, R-Biopharm та оцінити придатність методу на відповідність конкретних вимог для специфічного цільового використання шляхом отримання валідаційних даних: межі кількісного визначення, збіжності та відтворюваності.

Матеріал і методи досліджень

Валідацію методу кількісного визначення білка обробленого курячого яйця у харчових продуктах за допомогою тест-системи ІФА Ridascreen Egg, R-Biopharm проводили на базі Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи відповідно до вимог Регламенту Європейської Комісії № 2002/657/

ЄС (Comission Decision, 2002) та настанови Єврохім (Nastanova Eurachem, 2016).

Матеріалом для дослідження були негативні зразки матриці та збагачені зразки CRM (сертифікований референс-матеріал суміш для тортів). Об'єкти: суміш для тортів, соус для салату, шоколад, вермішель і печиво з низьким вмістом аналіту.

Діагностичний набір для визначення яєчного білка в харчових продуктах методом ІФА – Ridascreen Egg, R-Biopharm (R 6411). Дослідження проводилися на спектрофотометрі Sunrise за довжини хвилі 450 нм. Лунки мікротитрувальних смужок покриті специфічними антитілами проти овальбуміну та овомукоїду. Після додавання стандарту чи проби присутні овальбумін та овомукоїд зв'язуються зі специфічними антитілами, незв'язані речовини видаляються на стадії промивання.

Для інтерпретації результатів досліджень використовували програмне забезпечення для імуноферментного аналізу Ridascreen: Ridasoft Win.NET. Оцінка проводилася з використанням 4-параметричної функції.

Результати та їх обговорення

Валідація методу кількісного визначення білка обробленого курячого яйця у харчових продуктах проводилася шляхом визначення та оцінювання таких параметрів: межі детектування, межі кількісного визначення, збіжності, відтворюваності, точності та невизначеності.

Визначення межі детектування (LOD) проводили шляхом тридцятикратного аналізу проб з низьким

вмістом алергену в різних видах продуктів. Було розраховане стандартне відхилення результатів. До отриманого середнього значення результатів додавали трикратне стандартне відхилення.

Контроль межі кількісного визначення (LOQ) проводили шляхом тридцятикратного аналізу проб з низьким рівнем алергену в різних видах продуктів. Було розраховано стандартне відхилення результатів. До отриманого середнього значення результатів додали шестикратне стандартне відхилення.

Контроль збіжності (S_r) проводили шляхом п'ятнадцятикратного аналізу проб з низьким рівнем алергену різних продуктів. Зразки досліджувалися одним оператором, в тих самих умовах, у результаті чого оцінювали близькість результатів один до одного і визначали стандартне відхилення результатів.

Відтворюваність визначали багаторазовим дослідженням зразків у різних умовах із залученням різних операторів, де відображаються близькість один до одного результатів у різних умовах.

Точність проводили шляхом дослідження зразків сертифікованого референт матеріалу (CRM), з атестованим вмістом яєчного білка. При дослідженні проаналізували ступінь повернення аналіту, що відповідає межі допустимого значення від 80 до 110 %.

Розширену невизначеність оцінювали за результатами внутрішньолабораторної відтворюваності як добуток стандартної невизначеності u_p (у) на коефіцієнт охоплення K за рівня довіри $p = 0,95$.

Під час проведення оцінки придатності методу було отримано основні результати, наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Результати оцінювання придатності методу кількісного визначення білка обробленого курячого яйця у харчових продуктах

Параметри	Загальний білок	Яєчний білок
Збіжність (S _r), мг/кг	0,0282	0,0152
Збіжність (S _r), %	19,28	19,28
Внутрішньолабораторна відтворюваність (S _R), мг/кг	0,062	0,033
Внутрішньолабораторна відтворюваність (S _R), %	34,79	34,79
Точність, %	115	122
Межа детектування (LOD), мг/кг	0,3691	0,198
Межа кількісного визначення (LOQ), мг/кг	0,5575	0,3
Розширена невизначеність U, на рівні 0,18, мг/кг	0,125	0,067

Таким чином, параметри, які отримані під час валідації методу визначення яєчного білка, перебуває у допустимих межах відповідно до вимог Регламенту комісії ЄС 657/2002.

Висновки

Методика ІФА кількісного визначення білка обробленого курячого яйця у харчових продуктах пройшла успішну апробацію та відповідає вимогам Регламенту Комісії ЄС 2002/657, всі параметри валідації перебувають у прийнятних межах. Методика є придатною для досліджень харчових продуктів і рекомендована для використання у випробувальних лабораторіях.

Відомості про конфлікт інтересів

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів у даній роботі.

References

- Caubet, J. C., & Wang, J. (2011). Current understanding of egg allergy. *Pediatr. Clin. North Am.*, 58(2), 427–443. DOI: 10.1016/j.pcl.2011.02.014.
- Iweala, O. I., Choudhary, S. K., & Commins, S. P. (2018). *Food Allergy. Curr Gastroenterol Rep*, 20(5), 17. DOI: 10.1007/s11894-018-0624-y.
- Molekuliarnyi paket "Iaitse". URL: <https://dila.ua/labdir/2797.html> (in Ukrainian).

- Nastanova Eurachem (2016). Prydatnist analitychnykh metodiv dlia konkretnoho zastosuvannia. Nastanova dlia laboratorii z validatsii metodiv ta sumizhnykh pytan [Eurachem Guide: The Fitness for purpose of analytical methods. Laboratory guide to method validation and related] : za red. B. Mahnussona ta U. Ernemarka: pereklad drugoho vydannia. 2014 r. K.: TOV "Turka Liubchenka" (in Ukrainian).
- Peters, R. L., Krawiec, M., Koplin, J. J., & Santos, A. F. (2021). Update on food allergy. *Pediatr Allergy Immunol*, 32(4), 647–657. DOI: 10.1111/pai.13443.
- Rehlament Yevropeiskoho Parlamentu i Rady (IeS) № 1169/2011 vid 25 zhovtnia 2011 roku pro nadannia spozhyvacham informatsii pro kharchovi produkty, pro vnesennia zmin do rehlamentiv Yevropeiskoho Parlamentu i Rady (IeS) № 1924/2006 ta (IeS) № 1925/2006 ta pro skasuvannia Dyrektyvy Komisii 87/250/IeES, Dyrektyvy Rady 90/496/IeES, Dyrektyvy Komisii 1999/10/IeS, Dyrektyvy Yevropeiskoho Parlamentu i Rady 2000/13/IeS, Dyrektyvy Komisii 2002/67/IeS, Dyrektyvy Komisii 2008/5/IeS ta Rehlamentu Komisii (IeS) № 608/2004 (in Ukrainian).
- Savage, J., & Johns, C. B. (2015). Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunol Allergy Clin North Am*, 35(1), 45–59. DOI: 10.1016/j.iac.2014.09.004
- Seth, D., Poowutikul, P., Pansare, M., & Kamat, D. (2020). Food Allergy: A Review. *Pediatr Ann*, 49(1), e50–e58. DOI: 10.3928/19382359-20191206-01.
- Voronenko, Yu. V., Pukhlyk, B. M., Kuznetsova, L. V., Huliar, S. O., Frolov, V. M., Bobrov, O. Ye., Osypova, L. S., Havrylenko, T. I., Nazar, O. V., Litus, V. I., Prylutskyi, O. S., Piletskyi, A. M., Romaniuk, L. I., Hremiakov, V. O., Kuznetsov, O. H. (2008). Alerholohiia. Natsionalna medychna akademiia pisladyplomnoi osvity imeni P. L. Shupyka. Kyiv. URL: <https://allergo.kiev.ua/uploaded/files/%20алергологія.pdf> (in Ukrainian).
- Weatherspoon, D. (2017). Egg Allergies. URL: <https://www.healthline.com/health/allergies/egg>.
- Yu, W., Freeland, D. M. H., & Nadeau, K. C. (2016). Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 16(12), 751–765. DOI: 10.1038/nri.2016.111.
- Zakon Ukrainy vid 06.12.2018 № 2639-VIII «Pro informatsiiu dlia spozhyvachiv shchodo kharchovykh produktiv». URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2639-19#Text> (in Ukrainian).
- Comission Decision 657/2002 on the implementation of Council Directive 96/23 on the application of methods of analisis and interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*. 32 p.