

DIPLOMAMUNKA

Nagy Gábor Zsolt
Táplálkozástudományi mesterképzési szak
2012

Semmelweis Egyetem
Egészségtudományi Kar és a
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar

**Lisztérzékenyek által fogyasztható élelmiszerek
gluténszennyezettségének vizsgálata és
gluténtartalom mérési módszerek összehasonlítása**

Nagy Gábor Zsolt

Táplálkozástudományi Mesterképzési Szak

2012.

Témavezető: Dr. Varga Zsuzsa, főiskolai docens

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Absztrakt	4
1. Bevezetés.....	6
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1 A glutén bemutatása	8
2.2 A coeliakia (lisztérzékenység) bemutatása.....	11
2.2.1 A betegség epidemiológiája	11
2.2.2 A coeliakia patomechanizmusa	12
2.2.3 A coeliakia kimutatása	15
2.3 A gluténtartalom jogi szabályozása	16
2.4 A gluténtartalom meghatározási módszerek evolúciója.....	21
2.4.1 A mérési módszerekkel szemben támasztott elvárások	21
2.4.2 A mérést befolyásoló tényezők.....	21
2.4.3 Mikroszkópos módszer	22
2.4.4 Elektroforetikus módszerek.....	23
2.4.5 Kromatográfiás módszer	24
2.4.6 Immunológiai módszerek.....	28
2.4.7 Polimeráz-láncreakció (PCR).....	33

3. A glutén szennyezettség önálló vizsgálata	35
3.1 A kutatás célkitűzése	35
3.2 A vizsgálat tárgya.....	35
3.3 Hipotézisek	35
3.4 GÖ-gliadin meghatározására alkalmas módszer bemutatása.....	36
3.5 R5 módszer bemutatása	40
3.6 Mintavétel bemutatása	45
4. Eredmények	46
4.1 Színváltozások a mikroplate-lemezen	46
4.2 TEPNEL és R5 módszerek összehasonlítása	47
4.3 Zabtermékek gluténszennyezettsége.....	49
4.4 Lisztek gluténszennyezettsége	50
4.5 Különleges táplálkozási célú élelmiszerek gluténszennyezettsége	52
4.6 Biotermékek gluténszennyezettsége.....	53
5. Diskusszió.....	54
6. Következtetések és javaslatok	57
Összefoglalás	62
Irodalomjegyzék	63
Köszönetnyilvánítás	68
Záradék.....	69
Mellékletek.....	

Absztrakt

A coeliakia egy autoimmun betegség, melyet a búzában, árpában, rozsbán, zabban található prolaminok váltanak ki az arra érzékeny egyéneknél. A betegség és tünetei műtéti vagy gyógyszeres úton nem szüntethetők meg. Az egyetlen megoldást a egész életen át tartó gluténmentes diéta jelenti, amellyel teljes tünetmentesség érhető el. Az Európai Unió jogszabályt alkotott, melyben meghatározta a lisztérzékenyek számára fogyasztható élelmiszerek gluténtartalmi határértékeit. Ennek értelmében 20 mg/kg gluténtartalom alatt gluténmentesnek, 20-100 mg/kg között nagyon alacsony gluténtartalmúnak nevezhetjük az élelmiszereket.

Saját kutatásomban kereskedelmi forgalomban kapható természetesen gluténmentes, különleges táplálkozási célra készült, valamint zabtermékeket vizsgáltam gluténszennyezettség szempontjából. A méréshez két, szendvics ELISA alapokon nyugvó módszert alkalmaztam. Az egyik az G-D-gliadin kimutatására alkalmas módszer, a másik pedig a gliadin-epitópok felismerésére alkalmas R5 módszer. A vizsgálat kiterjedt a két módszer összehasonlítására is.

A vizsgálat eredményeit több szempont szerint csoportosítottam és értékeltem. Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált minták mindegyike eltérő mértékben szennyezett gluténnal. A zabtermékek 33%-a, a lisztek 17 %-a, a különleges táplálkozási célra készült gluténmentes élelmiszerek 16 %-a és a biotermékek 33 %-a tartalmazott jogszabályi határértéken (20 mg/kg) felüli gluténszennyeződést.

A két módszer összehasonlítása során arra a megállapításra jutottam, hogy a két módszer mérési eredményei eltérnek egymástól. A különbség nem csak számértékbeli eltérést jelent, hanem gluténtartalmi kategóriaváltozást is.

A vizsgálat alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható természetesen gluténmentes, valamint zabtermékek az aratás, szállítás, feldolgozás során eltérő mértékben szennyeződnek gluténnal. A két mérési módszer eredményei között pedig szignifikáns különbség van.

Abstract

The celiac disease is a kind of autoimmune disease, which is caused by the prolamins in wheat, barley, rye, oat in people who sensitive for that. The disease and it's symptoms can not be dissolved by surgery or medicine. The only solution is the lifelong gluten-free diet, which effects full symptom free life. The European Union made a law in which it determined the gluten treshold limits of foods, which is allowed to eat for the celiac diseased people. According to this law the foods with 0 - 20 mg/kg gluten contamination are called gluten-free, and the foods, wich contain contamination between 20 - 100 mg/kg, called foods with very low amount of gluten.

In my study I analysed products which are naturally gluten-free, made for special nutrition needs, made from oat. These products can be bought in shops, supermarkets. I examined the gluten contamination of these products. For the measuring I used two sandwich ELISA based methods. The first one is a method, which is able to measure G̅- gliadin. The second one is called R5 method, which is able to recognise epitops of gliadin. The examination also covered the comparison of the two methods.

I grouped and analysed the results of survey by more aspects. The results showed, that all of the samples were contaminated by gluten in different amounts. 33 % of oat products, 17 % of flours, 16 % of products made for special nutrition needs, 33 % of bio products contained gluten contamination over the treshold limit (20 mg/kg).

During the comparison of the two methods, I realised the following statement: the results of the two different methods are differ from each other. The difference means not only variance in numbers, but changing in gluten categories.

By the end of my examination I created two final satementes. The naturally gluten-free and oat products, which can be bought is shops, are contaminated with gluten through the harvest, transport, process in different amounts. Among the results of two measuring methods there is a significant difference.

1. Bevezetés

A coeliakia vagy más néven lisztérzékenység egy genetikailag predesztinált autoimmun betegség. A búza, árpa, rozs, zab és gabonafélékben található prolaminok hatására túlérzékenységi reakció indul el az arra érzékeny egyének szervezetében, konkrétan a tápcsatornában. A betegség kellemetlen tünetekkel jár, s ezen felül, ha nem diagnosztizálják időben, akkor fejlődési, szervi problémákat is eredményezhet. A betegség kezelésére jelenleg csak egyetlen lehetőség áll rendelkezésre: az egész életen át tartó gluténmentes diéta. A betegek számára tehát csak olyan élelmiszerek fogyaszthatók, melyek nem tartalmaznak glutént. Ide sorolhatók a mesterségesen gluténmentesített élelmiszerek, valamint a természetesen gluténmentes élelmiszerek. A lisztérzékeny betegek egy része pedig fogyaszthat zabtermékeket is. A diéta betartásával fiatal korban pár hét alatt tapasztalható a javulás és a tünetmentesség, idősebb korban évek is eltelhetnek a javulásig. Így egyértelmű, hogy a lisztérzékenyek számára fogyasztható élelmiszerek minősége, gluténmentessége kulcskérdés a betegek számára. Ugyanis ha gyógyulás után az élelmiszerükbe glutén kerül, akkor a tünetek újra jelentkeznek, és tovább rontják a már valamennyire stabilizálódott életminőséget.

Egy magyarországi vizsgálat kimutatta, hogy a lisztérzékeny gyermekek aránya 1:80. Ez a környező országokhoz képest gyakorinak mondható. Felmerült bennem a kérdés, hogy ha már ilyen gyakori nálunk ez a betegség, akkor a kereskedelem vajon ki tudja-e elégíteni a betegek speciális diétaigényét. 2012-ben már kijelenthetjük, hogy a mennyiségi igényeket kielégíti a piac, és egyre több helyen hozzáférhető a gluténmentes termékek. A mennyiség mellett azonban érdemes elgondolkodni a minőségen is. Arra vonatkozóan, hogy hol lehet ilyen termékeket kapni, már elég sok információ elérhető az interneten és médiában. Azonban arról még kevés információ áll rendelkezésre, hogy ezen termékek mennyire megbízhatóak. Tényleg gluténmentesek-e? Ha egy terméket nap mint nap fogyasztok, biztos lehetek-e benne, hogy az nem tartalmaz az egészségemre káros glutént? Ezen gondolatok voltak azok, melyek motiváltak arra, hogy elkezdjek foglalkozni a gluténmentes élelmiszerek vizsgálatával, konkrétan a lehetséges gluténszennyezettség kérdésével. Érdeklődésem központjába egyrésről a természetesen gluténmentes élelmiszerek kerültek. Egy olyan növényből készült termékről, ami természetesen nem sorolható rendszertanilag a gluténtartalmú növények közé, az feltételezhető, hogy nincs benne glutén. Arra voltam kíváncsi, hogy ez tényleg így van-e.

A gluténmentes diétát tekintve egy másik érdekes kérdésnek tekinthető a zab kérdése. Hosszú évekig azt tartották, hogy a lisztérzékenyek nem fogyaszthatnak zabot, mert az is tüneteket vált ki. Az elmúlt pár évben azonban módosult ez az álláspont. Olyannyira, hogy a lisztérzékenyek egy része képes tolerálni a zabban levő fehérjét, és nyugodtan fogyaszthatja. Azonban, mint ahogy a természetesen gluténmentes termékeknél, itt is felmerült bennem a kérdés, hogy vajon szennyeződik-e a kereskedelmi forgalomban levő zab gluténnel. Ezért zabtermékeket is bevontam a vizsgálatomba.

Az elmúlt pár évben egyre hangsúlyosabbá vált az a kérdés, hogy a zöldségek és gyümölcsök termesztésénél mit érdemes választani: biogazdálkodási módot vagy pedig a vegyipar által hatékonynak mondott vegyszereket alkalmazó termesztést. Több olyan könyvet is olvastam, melyek azt taglalták pro és kontra, hogy melyik gazdálkodási mód hogyan befolyásolja a beltartalmat, termést. Gluténtartalomra nem találtam utalásokat. Ezért úgy döntöttem, hogy vásárolok biotermesztésű gluténmentes termékeket és megvizsgálom a gluténszennyezettségüket.

A glutén kimutatására az elmúlt évtizedekben többféle módszert is kidolgoztak. El kellett döntenem, hogy melyik módszerrel fogom megvizsgálni az általam vásárolt élelmiszermintákat. Hosszas irodalmi kutatás után a két leggyakrabban alkalmazott módszert választottam: GQ-gliadin kimutatására alkalmas módszert (ezt a szakdolgozat további részeiben TEPNEL néven is fogom használni) és az R5 módszert. Úgy gondoltam érdemes mindkét módszert kipróbálni. Egyrészt a kétféle mérés megbízhatóbb eredményt fog adni a szennyezettség kérdésére, másrészt pedig lehetőségem lesz összehasonlítani a két módszert.

2. Irodalmi áttekintés

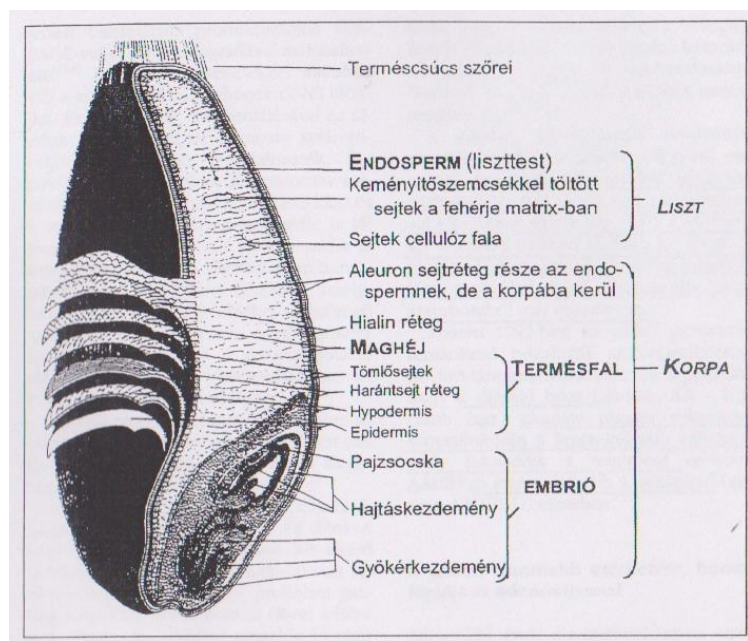
2.1 A glutén bemutatása

A magyar élelmiszerfogyasztás alapját képezik a gabonafélékből (búza, árpa, rozs, zab) készült termékek. Növényrendszertani szempontból a gabonafélék a pázsitfűfélék közé tartoznak és sok rokon ággal rendelkeznek (1. ábra). A közös eredet okán bizonyos tulajdonságokban megegyeznek egymással eme rokon fajok, bizonyos tulajdonságokban eltérnek egymástól. Az ábrán látható, hogy a búza, rozs, árpa, és tritikálé egy rendszertani csoportba tartoznak. Ezt igazolják fehérjék összetétele, hasonló tulajdonságaik. Ahogy távolodunk ezen rendszertani csoporttól (pl. rizs), úgy változik a növényi fehérjék összetétele és allergenitása (Takács, 2008).



1. ábra: Rokonsági fa gabonafélék és pszeudocereáliák esetében (Takács, 2008)

A magyar mezőgazdaságban legnagyobb mennyiségben termesztett gabonaféle a búza. A szem felépítése sokrétű, főbb részei az endosperm, a termésfal, az embrió (2. ábra).



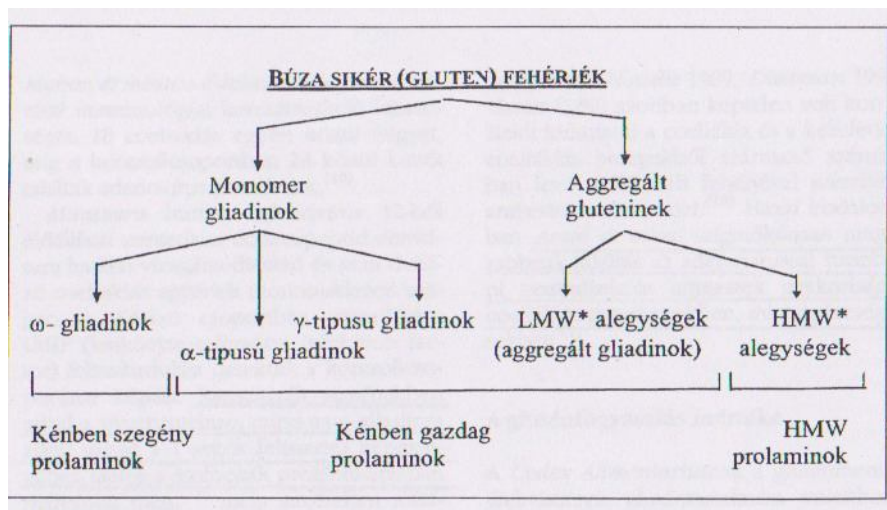
2.ábra: A búzaszem hosszmeteszete (Tímár & Matuz, 1996)

A búzaszem súlyának 82-86%-át az endosperm teszi ki. Ez a rész azért jelentős, mert itt képződnek és raktározódnak az azonnal felhasználuló, valamint olyan fehérjék, melyek a keményítőszemcsék között raktározódnak el. Az endosperm fehérjéit először Osborne osztályozta oldékonyságuk alapján (Osborne, 1907):

- vízben oldódó fehérjék: albuminok
- sóban oldódó fehérjék: globulinok
- alkoholban oldódó fehérjék: gliadinok
- savakban és lúgokban oldódó fehérjék: gluteninek

Ezen fehérjék közül a gliadinok és a gluteninek együtt alkotják a glutént (sikért). Ezen polimer molekula egyedi strukturális tulajdonságokkal rendelkezik: tiol és szulfid hidak szárazság és hőstressz esetén is meggátolják a benne található keményítő kiáramlását a fehérjevázból. Ennek sütőipari szempontból van nagy jelentősége: ha nedvességet kap a siker, akkor egy olyan térhálós polimer szerkezet jön létre, mely az élesztőgombák által termelt gázbuborékokat nem ereszt át és így megkeli a kenyér.

A glutén fehérjéit analitikai módszerekkel tovább tudjuk csoportosítani. A 3. ábrán a hagyományos és molekuláris módszerekkel történő differenciálás eredményei láthatók.



3.ábra: A siker fehérjék hagyományos (funkcionális) és új (molekuláris) osztályozásának összehasonlítása (Shewry, Tatham, Forde, Kreis, Miflin, 1986)

Hagyományos módszerrel (funkcionalitást vizsgálva) az alábbi csoportokat különíthetjük el:

- Monomer gliadinok (G-gliadinok, alfa-gliadinok, Y-gliadinok)
- Aggregált gluteninek (kis molekulatömegű alegységek, nagy molekulatömegű alegységek)

Molekuláris összetétel vizsgálata alapján az említett csoportok tagjai más csoportkategóriákba oszthatók be:

- Kénben szegény prolamínok: G-gliadinok
- Kénben gazdag prolamínok: alfa-gliadinok, Y-gliadinok, kis molekulatömegű alegységek
- Nagy molekulatömegű prolamínok: nagy molekulatömegű alegységek

Más közfogyasztású gabonafélékben is kimutathatók prolamínok, amik fajspecifikusak: árpában a hordein, zabban az avenin, rozsban a secalin, kukoricában zein a jellegzetes prolamín (Tímár & Matuz, 1996).

Összefoglalva a glutén búzából, roszból, árpából, zabból és ezek keresztezett változataiból, valamint ezek származékaiból származó fehérjefrakció, amelyet bizonyos egyének nem tudnak tolerálni, és amely vízben és 0,5 M nátrium-klorid oldatban oldhatatlan.

2.2 Coeliakia (lisztérzékenység) bemutatása

Táplálkozásunkban a gabonafélék alapvető fontosságúak: a lakosság energiabevitelének kb 50%-a, fehérjebevitelének kb 40%-a cereáliákból származik. (Horacsek, 1995). Azonban bizonyos gabonafélék (búza, árpa, rozs, zab) fogyasztása a lakosság egy részénél allergiás tüneteket, autoimmunbetegséget váltanak ki. Kimutatták, hogy egyes gabonafélék glutén toxicitása párhuzamos azok amid nitrogén tartalmával, így a következő toxicitási sorrend állítható fel: búza > rozs > árpa > zab. (Tímár & Matuz, 1996)

A gabonafélék által előidézett allergiának, túlérzékenységnek két csoportját különíthetjük el: gabona allergia és coeliakia. A kettő között jelentős különbség az, hogy míg a gabonaallergia esetében a gyulladós tüneteket glutén, albuminok, globulinok is eredményezhetik, addig a coeliakiára jellemző autoimmun folyamatot csak a gabonaszem glutén fehérjefrakciója váltja ki. (Takács, 2008). A coeliakia (gluténszenzitív enteropathia) a vékonybél krónikus, malabsorptióhoz vezető betegsége, melyet genetikailag fogékony egyéneknél az étkezéssel bevitt glutén idéz elő. (Juhász, 2009)

2.2.1 A betegség epidemiológiája:

Annak megállapítása, hogy jelenleg Magyarországon és Európában hány ember szenved coeliakiában, egy rendkívül nehéz feladat. Ennek oka, hogy a betegségnek nincs konkrétan behatárolható korfüggése. Korábban a diagnosztizált betegek többsége 2 év alatti gyermek volt. Mostanra a betegség bármely életkorban jelentkezhet. A tipikus tünetek mellett atipikus tüneteket, szövődményeket is eredményezhet. A betegség felismerése még gyakorlott orvosok számára sem egyszerű. A coeliakia egyértelmű megállapításához több lépcsős diagnosztika szükséges.

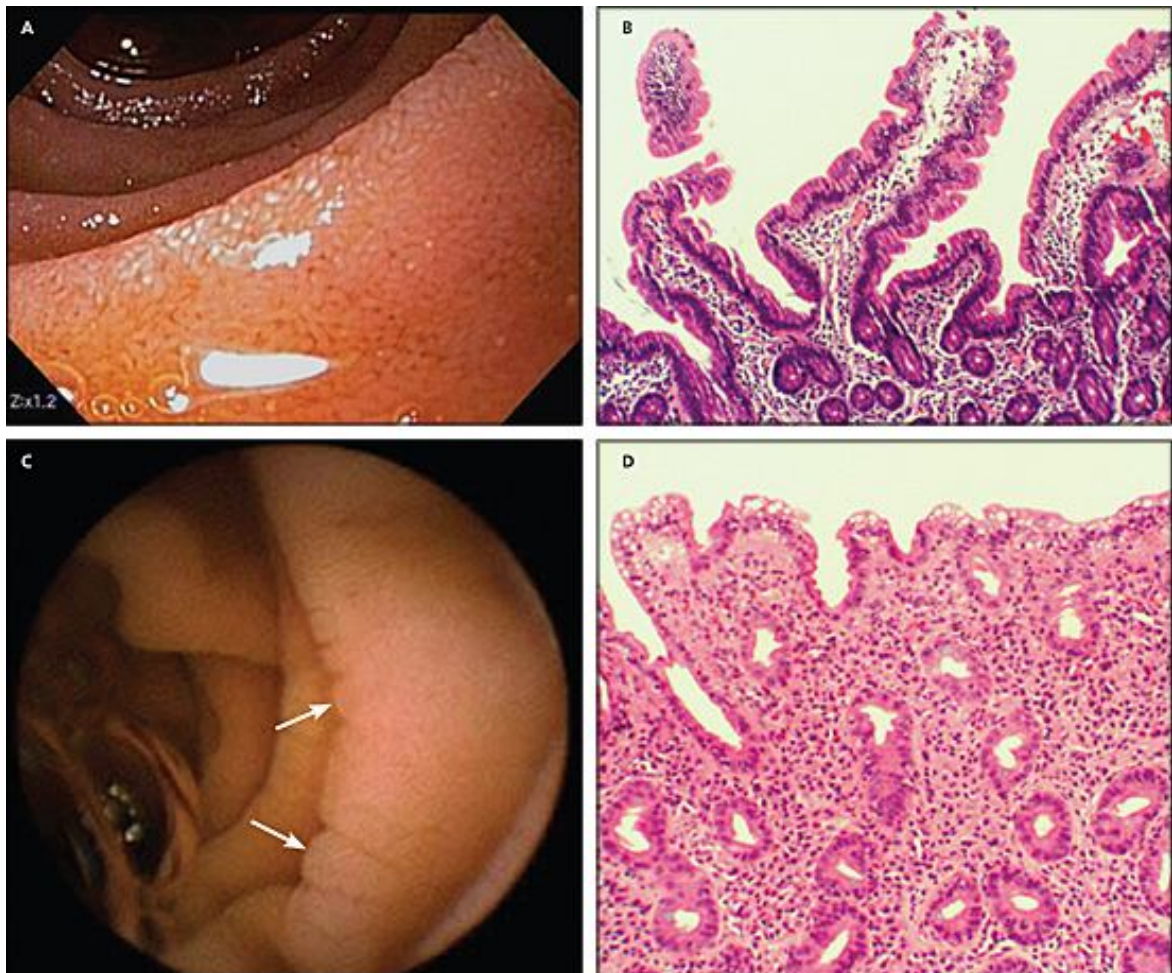
A regisztrált betegek száma alapján a következő előfordulás rajzolódik ki Európában (Juhász, 2009 ; Juhász, 2008):

Magyarország: **1:80** (gyermek)
Olaszország: **1:100 – 1:300** (gyerekek)
Svédország: **1:285** (gyerekek) és
1:500 (felnőttek)

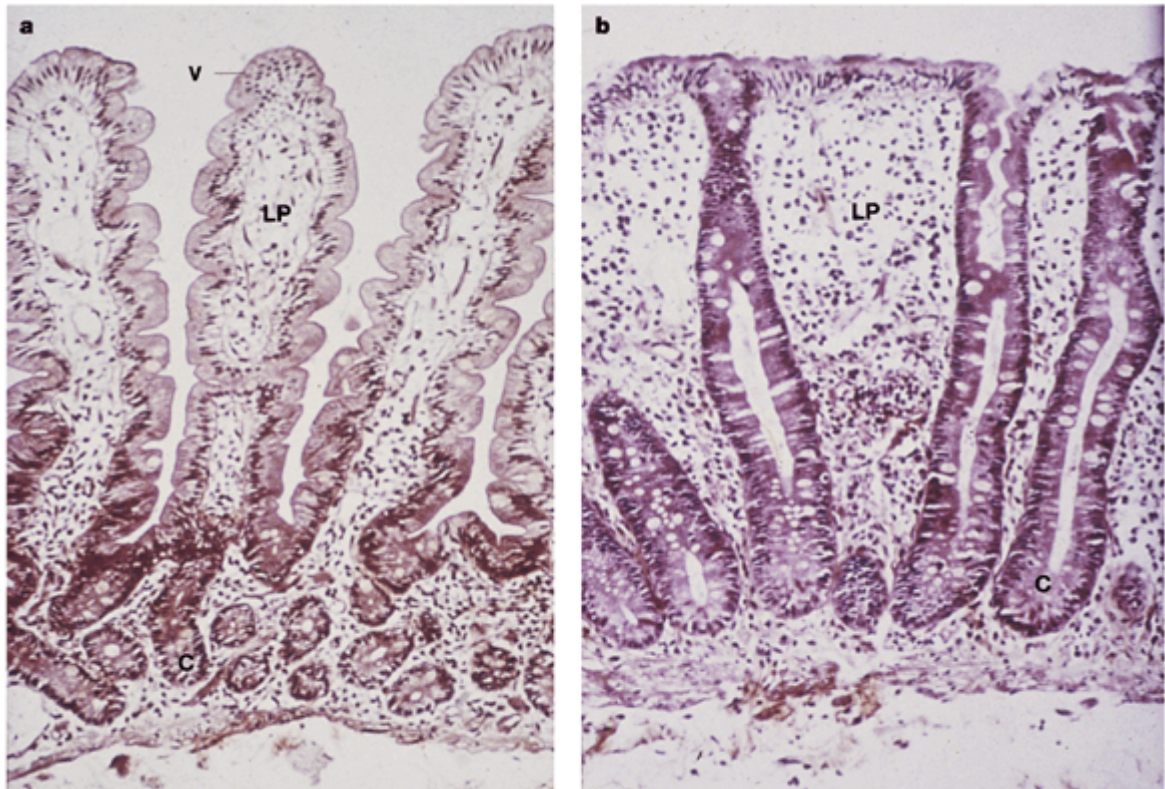
Norvégia: **1:285** (felnőttek)
Írország: **1:300** (felnőttek)
Észak-Írország: **1:122** (felnőttek)
Horvátország: **1:520** (gyerekek)

2.2.2 A coeliakia patomechanizmusa

A coeliakia során a tápcsatornába jutott glutén elérve a vékonybélbe autoimmun folyamatokat indukál, melynek eredményeképpen a nyálkahártya és bélbolyhok rendszer atrofizálódik (4.ábra). A bolyhok mintázata ellapul, a crypták megnyúlnak, megnagyobbodnak és sejtjeikben megnő a mitotikus aktivitás (5.ábra). A felszíni epithélium is ellapul, és csökken az enzimatis aktivitás.



4.ábra: Endoszkópos és biopsziás eredmények egészséges (A,B) és coeliakia betegségben szenvedő (C,D) embereknél. (JOHN PRESUTTI et al, 2007)



Nature Reviews | Immunology

5.ábra: Egészséges ember bélbolyhainak felszíne „A” és lisztérzékeny beteg bélbolyhainak felszíne „B” (Ludvig, 2002)

Felszaporodnak intraepithelialis lymphocyták, melyet nagymértékű T-sejt aktiválás követ. A glutént alkotó gliadin, mikor bejut a szervezetbe, a vékonybélben összekapcsolódik a szöveti transzglutaminázzal (cytosolban aktív kalciumdependens enzim). A szöveti transzglutamináz a gliadin peptideket deamidálja, mely folyamat eredményeként peptidepitópok jönnek létre (amihez HLA-DQ2 fehérje is képes kapcsolódni). Az újonnan kialakult komplex indítja be a CD4+ T sejtek által vezérelt autoantitest képzést, melynek eredményeként a szervezet saját sejtjei ellen termel ellenanyagot, így pusztítva a vékonybél bélbolyhait

A vékonybél nyálkahártyájának atrofizálódásának eredménye lesz a tápanyag felszívódás fokozódó romlása, valamint egy idő után fiziológias folyamatok megfordulása, szekréciója. A felszívódás romlása a szervezet több pontján kóros működéshez, hiányproblémák kialakulásához vezet.

Az alábbi táblázatban (I. táblázat) összegyűjtöttem a coeliakia jellemző tüneteit:

hasmenés	steatorrhoea
meteorismus	nausea/vomitus
ismétlődő hasi fájdalmak	fogyás (anorexia)
gyengeség	fáradékonyság, állandó fáradtság érzése
szájüreg-nyálkahártya apthosus laeoi	fogzománc-hypoplasia
anaemia (vashiány, folsavhiány)	oedema
hypoplensimus	infertilitás
ismétlődő abortusok	ataxia
gyermekkori növekedési zavar	lezajlott rahitis jelei
osteopenia, osteoporosis	osteomalacia
csontfájdalom	arthalgia
tetania	dobverőújj
depresszió	

I.táblázat: A coeliakia jellemző tünetei (Juhász, 2009)

Abban az esetben, ha a coeliakiát nem veszik észre, vagy a diagnosztizált beteg nem folytat gluténmentes diétát, akkor különböző betegségek társulhatnak az alapbetegséghez. Ez diagnosztizált betegnél egészségének romlását eredményezi, nem diagnosztizált betegnél viszont a coeliakia alapbetegség felismerését fogja nehezíteni (Juhász, 2009). Az alábbi táblázatban (II. táblázat) a társuló betegségeket mutatom be:

Bizonyított kapcsolat a coeliakiával	Feltételezett kapcsolat a coeliakiával
dermatitis herpetiformis	IgA-nephropatia
1-es típusú diabetes mellitus	alopecia areata
autoimmun thyreoditisek	primer billiaris cirrhosis
Sjörgen szindróma	primer szklerotizáló cholangitis
Szelektív IgA hiány	autoimmun hepatitis
Rekurrens apthosus stomatitis	IBD, sclerosis multiplex

II.táblázat: A coeliakiához bizonyítottan és feltételezhetően társuló betegségek (Juhász, 2009)

2.2.3 A coeliakia kimutatása

A coeliakai felismerése és kimutatása egy többlépcsős folyamat eredménye.

1. Fel kell ismerni a betegségre utaló tüneteket
2. Ellenanyag kimutatása a szervezetben (IgA EMA, tTG)
3. Biopsia a vékonybélből

Az elvégzett vizsgálatok fényében coeliakia valószínűsíthető, ha az alábbiak közül legalább 3 jelen van (Korponay-Szabó, 2008):

- gluténmentes diétával javulnak a klinikai tünetek
- endomysium vagy transzglutamináz antitest pozitivitás
- HLA-DQ2 vagy HLA-DQ8 jelenléte
- emelkedett intraepithelialis lymphocytaszámmal jellemezhető gyulladás a vékonybélben

A coeliakiának 3 típusát különböztethetjük meg az ismert indikátorjelenségek megléte, részleges megléte alapján (Magyar, 2008):

- látens coeliakia: A gluténérzékenység fennáll, de a beteg tünetmentes. Az EMA / tTG pozitív eredményt mutathat (szeropozitivitás), viszont nem tapasztalható boholyatrófia.
- csendes coeliakia: szeropozitivitás és boholyatrófia fennáll, de a beteg tünetmentes. Viszont kimutatható vashiány, anaemia, osteoporozis.
- aktív coeliakia: súlyos boholyatrófia, magas titerű szeropozitivitás valamint tipusos/atipusos klinikai tünetek.

2.3 A gluténtartalom jogi szabályozása

A lisztérzékenységben szenvedő beteg számára egyedüli megoldás normális életvitelük és egészségük megőrzésében az, ha egész életen át tartó gluténmentes diétát tartanak. Ennek megvalósítása nem egyszerű dolog. A boltok polcain kapható termékek nagy része részösszetevőként tartalmazhat keményítőt, glutént, azonban ennek feltüntetése nem kap kifejezett hangsúlyt a címkéken. Annak, hogy ha egy termékben alkalmaznak gluténtartalmú összetevőt, de ez nincs feltüntetve, és a lisztérzékenységben szenvedő beteg ezt a terméket fogyasztja hosszú távon, annak komoly egészségügyi következményei lehetnek: kedvezőtlen immunreakciók játszódhatnak le az adott termék elfogyasztását követően. Több szakmai érdekszervezet, főként az Európai Coeliakiás Egyesületek Szövetsége hatására az Európai Unió felfigyelt a coeliakiában szenvedő emberek problémájára és jogi hatályban levő jogi szabályozások módosításával, új törvények megalkotásával próbálja az érintett lakosság életkörülményeit javítani közvetett módon („Mentőöv kezdő gluténérzékenyeknek,” 2012). Fő célja ezzel az EU-nak az, hogy magasabb szintű egészségvédelmet és a vásárlók megfelelő információhoz való jogát biztosítsa.

A továbbiakban ezen törvényi módosításokat, jelentősebb törvénykezéseket szeretném bemutatni.

2003/89/EC új irányelv

Ez a törvény a 2000/13/EC irányelv módosítása. Az új irányelv (89/2003/EC (XI.10.) Direktíva, 2003) a kész termékekben található allergének feltüntetési kötelezettségeit szabályozza. A törvény értelmében, a gyártó, ha a késztermék (alkoholos italokat is ide sorolva) gyártása során alkalmazott olyan hozzávalót, ami tartalmazza a potenciális allergének bármelyikét, köteles a termék csomagolásán, címkéjén jól látható módon ezt jelezni („Allergének címkézése élelmiszereinken,” 2005). A törvény felsorolja a potenciális allergének 12 csoportját, melyek a következők:

- **Glutént tartalmazó gabonafélék, és az azokból készült termékek**
- Héjas állatok (pl. rákok, kagylók) és azokból készült termékek
- Tojás és abból készült termékek
- Halak és abból készült termékek
- Földimogyorófélék és abból készült termékek

- Szója és abból készült termékek
- Tej- és tejtermékek (laktózt beleértve)
- Dió és hasonló termékek
- Zeller és abból készült termékek
- Mustár és abból készült termékek
- Szezám és abból készült termékek
- Kéndioxid és szulfitok, amennyiben koncentrációjuk több mint 10 mg/kg vagy 10 mg/liter

A listára később felkerült termékcsoportok:

- Csillagfürt és abból készült termékek
- Puhatestűek és abból készült termékek

A glutén a coeliakiás betegek számára allergén, ugyanis túlérzékenységi reakciót, autoimmun folyamatot vált ki. Ezen törvény által tehát a glutént is kötelezően feltüntetendő a késztermékek csomagolásán. Az EU ezen irányelve 2003. november 25-én került bevezetésre. A gyakorlatban 2005. november 25-től forgalomba került termékeknek már ezen új irányelvnek meg kell felelniük (89/2003/EC (XI.10.) Direktíva, 2003).

36/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet

Ez a rendelet (36/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet, 2004) megalkotja a különleges táplálkozási célú élelmiszerek fogalmát, mely a következőt jelenti: olyan élelmiszerek, amelyek különleges összetételük vagy az előállításuk során alkalmazott különleges eljárás következtében megfelelnek a meghatározott táplálkozási céloknak, egyértelműen megkülönböztethetők az általános közfogyasztásra készült élelmiszerektől és az erre való alkalmasságuk egyértelműen kifejezésre jut jelölésük, forgalomba hozataluk során.

Ezen élelmiszerek kielégítik olyan fogyasztók speciális táplálkozási igényeit,

- akik emésztési vagy anyagcsere zavarban szenvednek
- akiknek sajátos élettani állapotuk miatt bizonyos anyagok ellenőrzött mértékben történő fogyasztása előnyös
- akik olyan egészséges csecsemők és kisgyermek, akikről köztudott, hogy felnőttekétől eltérő speciális táplálkozási igényeik vannak

A rendelet megkülönbözteti ezen termékek két csoportját:

1. Külön, termékspecifikus rendelettel is szabályozott termékcsoporthoz
 - a. Anyatej-helyettesítő és anyatej-kiegészítő tápszerek
(20/2008. (V. 14.) EüM rendelet)
 - b. A speciális gyógyászati célra szánt tápszerek
(24/2003. (V. 9.) ESzCsM rendelet)
 - c. A csecsemők és kisgyermek számára készült feldolgozott gabona alapú élelmiszerek és bébiételek
(35/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet)
 - d. A testtömegcsökkentés céljára szolgáló, csökkentett energiatartalmú étrendben felhasználásra szánt élelmiszerek
(27/2004. (IV. 24.) ESzCsM rendelet)
 - e. **A glutén-érzékenyeknek szánt élelmiszerek
(41/2009/EK Bizottsági rendelet)**

2. Külön, termékspecifikus rendelettel nem szabályozott termékcsoporthoz
 - a. Nagy izomerő kifejtését elősegítő, elsősorban sportolóknak, nehéz fizikai munkát végzőknek szánt élelmiszerek
 - b. Szénhidrát anyagcserezavarokban szenvedők számára készült élelmiszerek

A rendelet előírja (a nemzeti jogharmonizáció keretében), hogy bizonyos termékcsoporthoz csak abban az esetben lehet Magyarországon forgalomba hozni, ha előtte a rendeletben megnevezett állami hivatali szerv (Országos Élelmezési és Táplálkozástudományi Intézet) felé bejelentette (notifikálta) a terméket a forgalomba hozatal napjáig. A gyártó köteles a bejelentéskor mellékelni a kérelmet alátámasztó dokumentumokat, valamint tudományos és szakmai indoklást, ezáltal bizonyítva, hogy terméke eleget tesz a különleges táplálkozási célú élelmiszerek szükséges kritériumainak („Különleges Táplálkozási Célú Élelmiszerek.”2012). Notifikáció-köteles termékcsoporthoz között szerepelnek a gluténérzékenyek számára készült termékek is!

A notifikáció-köteles csoportok:

- anyatej-helyettesítő tápszerek
- speciális gyógyászati célra szánt tápszerek
- gluténérzékenyeknek szánt élelmiszerek
- egyéb (a különleges táplálkozási célú élelmiszerek csoportosításban nem szereplő készítmények)

41/2009/EK rendelet

A 36/2004. (IV. 26.) ESzCsM rendelet külön termékspecifikus rendelettel is szabályozott termékcsoportjai közé tartoznak a gluténérzékenyeknek szánt élelmiszerek. Ezen csoportra vonatkozó jogi szabályozást a **41/2009/EK rendelet** (41/2009/EK (I.20) Bizottsági rendelet, 2009) tartalmazza, mely főként a gluténtartalomra vonatkozó, csomagoláson feltüntetett állításokat tisztázza uniós egységes szinten. A jogszabály létrejöttének fő indoka az volt, hogy korábban nem volt tisztázva az, hogy mit jelent a „gluténmentes” vagy ezzel egyenértékű kifejezés egy terméken. Ugyanis a különböző országokban más-más értelmezése, nemzeti szabályozása volt a gluténmentességnek és gyakorlati megvalósítás során eltérő gluténtartalmat eredményezett. Ez a rendelet az Unió egész területén egységesíti és tisztázza a gluténtartalomra vonatkozó állításokat és ezek mögött álló valódi gluténtartalmat. Az előírás 2012. január 1-től lépett érvénybe. („Gluténérzékenyeknek szánt élelmiszerek,”2012). A rendelet értelmében gluténérzékenyeknek szánt különleges táplálkozási célú élelmiszerekre az alábbi szabályozások vonatkoznak:

1. Gluténmentes kifejezést akkor lehet feltüntetni a termék csomagolásán, címkéjén ha...
 - egy vagy több olyan összetevőt tartalmaz vagy olyan összetevőből áll, amely a búzát, rozst, árpát, zabot vagy ezek keresztezett változatait helyettesítik, és nem tartalmaz 20 mg/kg-ot meghaladó mennyiségű glutént a végső fogyasztó számára értékesített élelmiszerben.
 - egy vagy több olyan, búzából, rozsból, árpából, zabból, vagy ezeknek a keresztezett változataiból készült összetevőt tartalmaz vagy ezekből áll, amelyet különleges eljárással úgy állítottak elő, hogy a gluténtartalmat lecsökkentették, és nem tartalmaz 20 mg/kg-ot

meghaladó mennyiségű glutént a végső fogyasztó számára értékesített élelmiszerben.

- benne található zabot olyan speciális módon állítják elő, készítik el és/vagy dolgozzák fel, hogy a búzával, rozssal, árpával, vagy ezek keresztezett változataival való szennyeződést elkerüljék, és az ilyen zab gluténtartalma nem haladhatja meg a 20 mg/kg-ot.

2. Nagyon alacsony gluténtartalmú kifejezést akkor lehet feltüntetni a termék csomagolásán, címkéjén ha...

- egy vagy több olyan, búzából, rozsból, árpából, zabból, vagy ezeknek a keresztezett változataiból készült összetevőt tartalmaz vagy ezekből áll, amelyet különleges eljárással úgy állítottak elő, hogy a gluténtartalmat lecsökkentették, és nem tartalmaznak 100 mg/kg-ot meghaladó mennyiségű glutént a végső fogyasztó számára értékesített élelmiszerben.

Az Európai Unió által hozott törvényeket, irányelveket a magyarországi törvényhozás és jogrendszer jogharmonizáció során folyamatosan építi be a magyar jogrendszerbe.

2.4 A gluténtartalom meghatározási módszerek evolúciója

2.4.1 A mérési módszerekkel szemben támasztott elvárások

A gluténtartalom meghatározása rendkívül fontos a lisztérzékenységben szenvedő betegek számára. Ugyanis szervezetükbe egyáltalán vagy csak kis mennyiségű (általuk tolerálható mennyiségű) glutén juthat be a táplálékkal, ellenkező esetben jelentkezni fognak a coeliakia tipusos tünetei.

Az Európai Unió törvényben szabályozta, hogy a kereskedelmi forgalomban levő gluténérzékenyek számára fogyasztható termékekben mekkora lehet a gluténfehérje határértéke: 20 mg/ kg (gluténmentes) és 20-100 mg/kg (nagyon alacsony gluténtartalom).

Az analitikai módszerekkel szembeni elvárások (Takács, 2008):

- magas specificitás és érzékenység
- csak nyomokban található allergének érzékelése
- mérési eredményük megbízható legyen
- mért eredmény pontos legyen
- kapott eredmény alapján eldönthessük, hogy a minta mely határértékfüggő kategóriába tartozik.
- gyorsaság
- reprodukálhatók legyenek az eredmények
- költséghatékonyak legyenek
- fehérje alapú gluténdetektálási módszer esetében ne csak a prolaminok natív formáját, hanem a feldolgozás utáni formát is felismerjék

2.4.2 A mérést befolyásoló tényezők

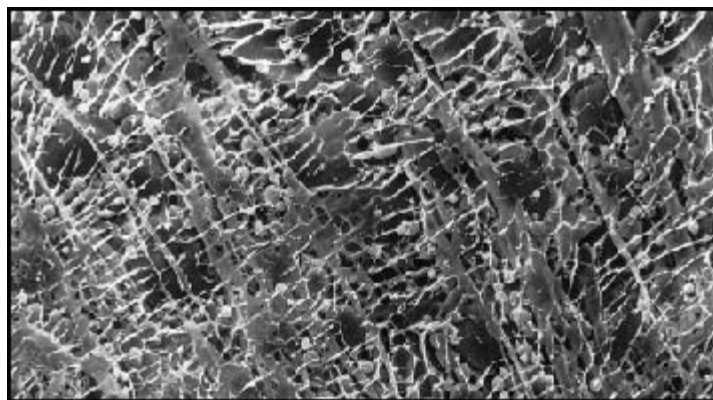
A kimutatás tárgya a glutén, mely különféle prolaminokból épül fel (Shewry et al., 1986). Elektroforetikus mobilitásuk alapján alfa, béta, gamma, G γ -prolaminokat különböztetünk meg, melyek mennyiségi megoszlása növényenként eltérő. Coeliakia szempontjából főként az alfa prolamin az, ami toxikus. Ebből következhet az a megállapítás, hogy akkor csupán alfa prolamin kimutatását kell szem előtt tartani a mérési módszer fejlesztésénél. Hőkezelés és feldolgozás során a gluténfehérjék fragmentálódnak és peptidekre esnek szét (Mena, Lombardía, Hernando, Méndez, Albar, 2012).

A fehérjeátalakulás eredményeként megváltoznak a prolaminok strukturális tulajdonságai, felszínük oldhatatlanná válhat, részben vagy teljesen hidrolizálódhatnak. A hőkezelt mintában például az alfa prolamin nem, csupán az ω -prolamin mutatható ki (Takács, 2008). A gliadin kimutathatósága csökken a sütés és főzés által, a végbemenő szerkezeti változásoknak köszönhetően. A végbemenő változások egyrésztől magyarázhatók a hőhatás nagyságával és a behatás időtartamával, másrésztől befolyásoló tényezőként hat az, hogy az adott élelmiszerben az élelmiszeralkotók (nedvesség, keményítő, tojás, cukor) milyen kölcsönhatásba lépnek a gliadinnal (Horacek, 1995).

2.4.3 Mikroszkópos módszer

A mikroszkópos módszer a legegyszerűbb formája a glutén vizsgálatának. Fénymikroszkóp alkalmazható például gluténminőség ellenőrzésére. Liszt vizsgálata során kimutatták, hogy a glutén alkotórészei közül a glutenin képes duzzadásra, a gliadin nem. Mialatt a glutenin megduzzad, addig a gliadin teljesen feloldódik (Eckert, Amend, Belitz, 1993).

A transzmissziós elektronmikroszkóppal (6.ábra) jól vizsgálható a glutén szerkezete és képződési folyamata. A glutén alapvetően az endosperm sejtekben található előanyagok aggregációjának és mechanikai átalakulásuknak eredményeként képződik. A legszembeütőbb bizonyos fehérjefilmek átalakulása: egy elágazó szerkezetből egy rétegszerkezet jön létre (Amend & Belitz, 1990).



6.ábra: A glutén transzmissziós elektronmikroszkóppal készített képe
(„Baking Industry,”2012)

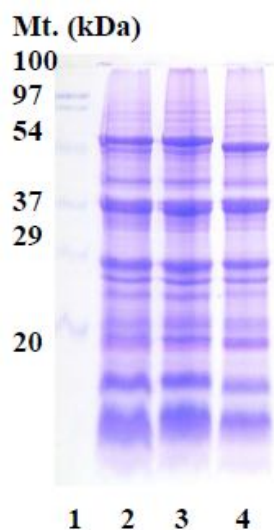
2.4.4 Elektroforetikus módszerek

Az elektroforézis olyan elválasztástechnika, melyben a molekulák erőter hatására különbözőképpen mozdulnak el, és ezáltal szétválaszthatók. Gélelektroforézis esetén a közeg, amiben a molekulák mozognak, hidrogél, leggyakrabban poliakrilamid, ritkábban agaróz (Takács, 2008).

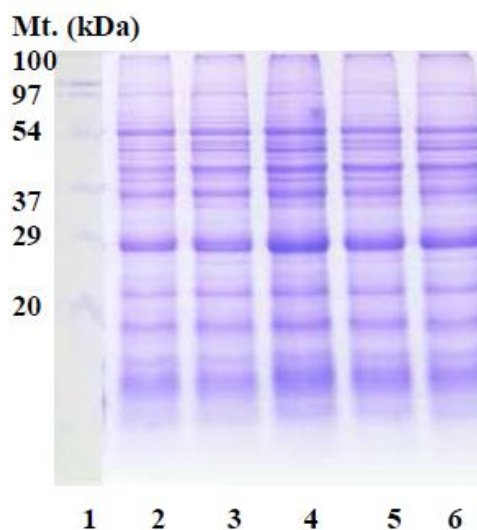
A különböző gabonafélék jellegzetes fehérjéinek, prolaminjainak elválasztására használhatók a natív- és SDS-PAGE módszerek.

A natív-PAGE (poliakrilamid gélelektroforézis) méret és töltés szerint képes szétválasztani a fehérjéket. A gélben azon molekulák haladnak gyorsabban, melyek nagyobb töltésűek illetve kisebb méretűek. Az egész folyamat vizuálisan is nyomon követhető, ha a gélhez marker festéket adnak.

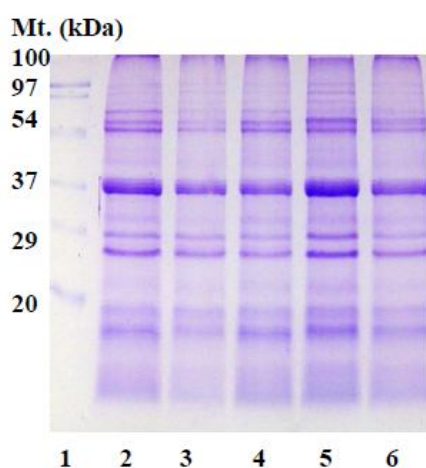
SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (7. ábra) esetében a fehérjéket detergenssekkel (merkaptó-etanol és nátrium dodecil-szulfát (SDS) és redukálószerekkel kezeljük. Redukálás és SDS hatására a fehérjékben található diszulfid hidak felbomlanak. A fehérjékre SDS molekulák kötődnek, melyek révén a pozitív töltések leárnyékolódnak és az apoláris részekre pedig negatív töltések kerülnek. Így minden fehérje negatív töltésű lesz és egy irányba (anód felé) vándorolnak. A fehérjék gélen való lefutási sebességét így már csak a méret fogja befolyásolni (Takács, 2008). Az SDS-PAGE kitűnően alkalmas búzagliadin kimutatására is. Azonban ha a vizsgált minta hőkezelésen (főzés, sütés) megy keresztül, a gliadin kimutathatósága romlik. A minta pelyhesítése érdekes módon alig ront a kimutathatóságon (Horacek, 1995).



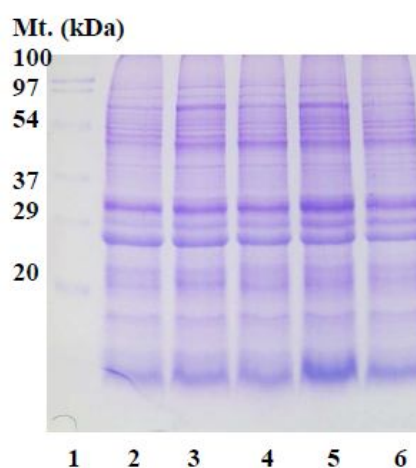
a. Amaránt



b. Hajdina



c. Kukorica



d. Rizs

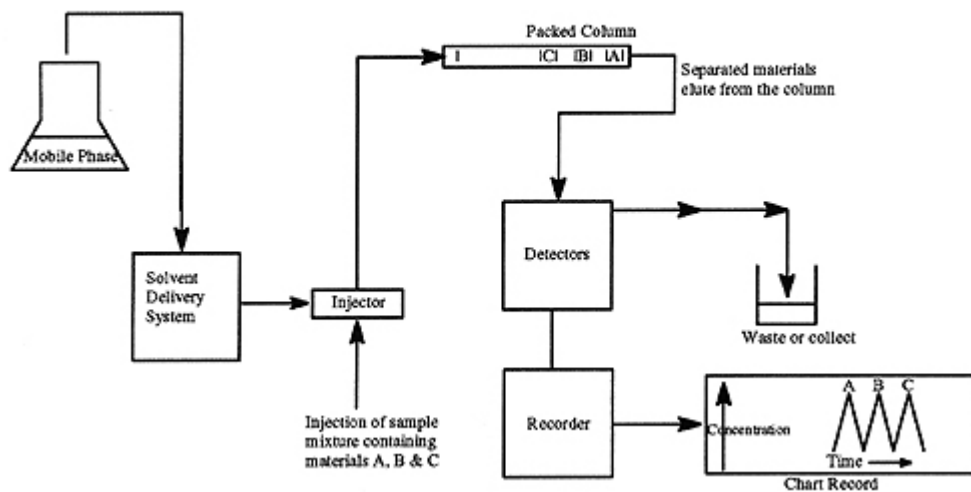
7.ábra: Természetesen gluténmentes növények SDS-PAGE képe (Takács, 2008)

2.4.5 Kromatográfiai módszer

A kromatográfiai módszerek közül a HPLC (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia) alkalmas eszköznek bizonyult a glutén és prolaminjainak kimutatása tekintetében. A HPLC rendszer a következő alkotórészekből áll: a kromatográfiai töltet (állófázist) tartalmazó oszlopból (kolonnából), a mobil fázist (mozgó fázist, eluent) az oszlopon átnyomó pumpából, valamint a molekulák retenció

(visszatartási) idejét jelző detektorból (8.ábra). A retenciós idő az álló fázis, a vizsgált molekula és a mozgó fázis közötti kölcsönhatásoktól függ (Gasztonyi, 1987).

Block diagram showing the components of an HPLC instrument



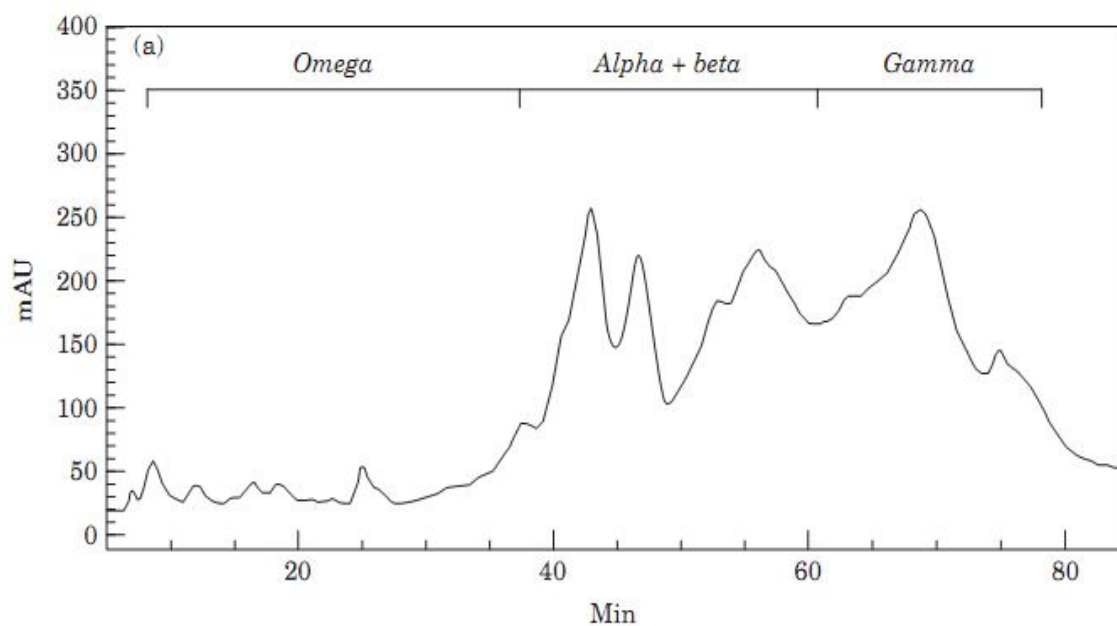
8.ábra: A HPLC sematikus felépítése (Gasztonyi, 1987)

A vizsgálandó oldatot megfelelő oldószerben fel kell oldani, majd az oldat meghatározott térfogatát be kell fecskendezni a mozgó fázisba. A minta a mozgó fázis áramlatával halad, keresztüljutva a szilárd fázison a kolonnában. A szilárd fázison való áthaladás során a minta és a kolonna között fizikai, kémiai kölcsönhatások jönnek létre, melyek azt eredményezik, hogy a minta lassabban áramlik a folyadékfázishoz képest. Azt az időtartamot, ami alatt a minta alkotói megjelennek a kolonna végén (eluálódnak) retenciós időnek nevezzük. Ez minden alkotóanyag egyedi jellemzője. Ezen retenciós idők segítségével lehet az alkotórészeket megkülönböztetni, majd számítógép segítségével a különbségeket grafikusán ábrázolni (Gasztonyi, 1987).

Glutén detektálás szempontjából a normál fázisú és a fordított fázisú kromatográfia (RF-HPLC) a fontosabb HPLC típusok. Mindkettő polaritás alapján választja el a vizsgált minta komponenseit. A fő különbség a két módszer között, hogy míg a normál fázisú HPLC poláris álló fázist és apoláris mozgó fázist tartalmaz, addig a fordított fázisú HPLC állófázis felülete apoláris és mozgó fázisa pedig poláris.

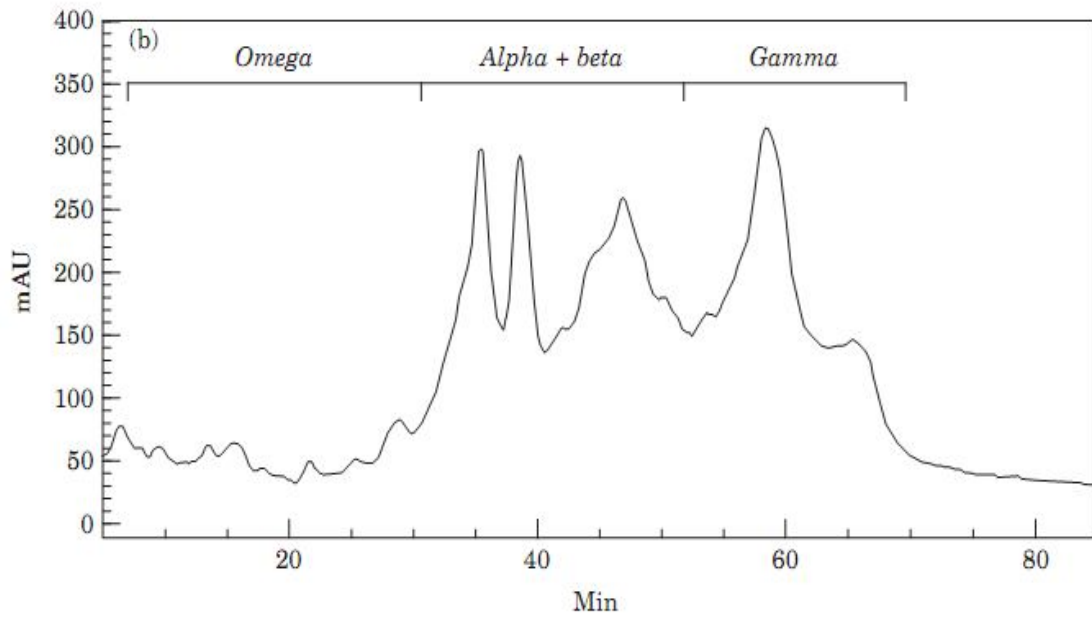
Egy gabonavizsgálatban összehasonlítottak két búzafajtát, melyek terméséből készült kenyerek térsza keménységben és a süthetőségi potenciálban különböztek. Méretkizárásos HPLC segítségével, mely méret alapján választja el a részecskéket,

megkülönböztették a glutén különböző frakcióit. Valamint a kapott mérési eredmények bebizonyították, hogy a jobb tézstaállaggal és kedvezőbb sütési tulajdonságokkal rendelkező búzafajban nagyobb arányban mutatható ki glutenin (Lundh & Macritchie[†],1989). Új-Zélandon fordított fázisú HPLC használatával bizonyították be, hogy a specifikus glutenin frakció mennyisége egyenes arányban van az adott búzából készült tézsta minőségével (Sutton, Hay, Griffin, 1989). Az RF-HPLC segítségével gyönyörűen elkülöníthető a gliadin négy jellegzetes frakciója (9, 10 ábra). A kapott eredményeket nagyban befolyásolja, hogy a folyékony fázisban milyen oldószereket alkalmazunk (Arangoa & Campanero, 2000).

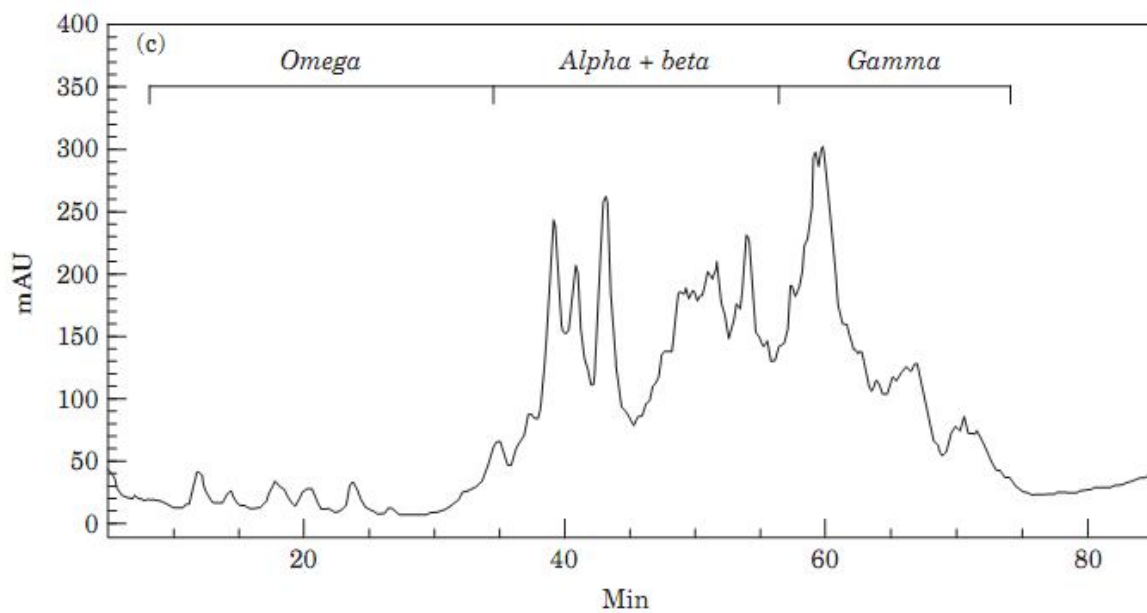


15% acetonitrile (a),

9.ábra: A gliadin frakcióinak képe RF-HPLC vizsgálat során, abban az esetben, mikor az oldószer 15%-os acetonitril (a) (Arangoa & Campanero, 2000)



0.1 M sodium chloride and 15% acetonitrile (b),



0.1 M sodium perchlorate and 15% acetonitrile (c).

10.ábra: A gliadin frakcióinak képe RF-HPLC vizsgálat során, abban az esetben, mikor az oldószer 15%-os acetonitril és 0,1 M szódium-klorid keveréke (b), 15%-os acetonitril és 0,1 M szódium-perklorát keveréke (c) (Arangoa & Campanero, 2000)

2.4.6 Immunológiai módszerek

A glutén immunológiai alapon történő kimutatására többféle módszert fejlesztettek ki. A kimutatás pontossága alapján két csoportba érdemes besorolni őket:

1. Kvalitatív és félkvantitatív módszerek (RIE, immunblott, dotblott, immunkromatográfiás gyorseszteszt, RAST, EAST)
2. Kvantitatív módszerek (ELISA)

Az élelmiszerekben levő allergének kimutatására az IgE-specifikus humán szérumokkal történő vizsgálat nem validálható detektálási módszer, hiszen adott allergénre érzékeny allergiás betegek szérumai egyénekenként más IgE-specificitást mutatnak, valamint a szérumok mennyisége is limitált a vizsgálatokhoz. A gyakorlatban az allergén kimutatásához kísérleti állatokban termeltetnek ellenanyagot az adott allergén ellen. Napjainkban csak néhány validált, kimutatási módszer létezik ELISA kitek, gyors immuneszteszt formájában. Ezen módszereket a potenciális élelmiszerallergénekre dolgozták ki (pl. glutén, tej, szója, mustár, mogyoró stb) (Takács, 2008).

A lisztérzékenyek szempontjából a félkvantitatív és kvantitatív vizsgálmódszereknek van jelentősége. Ezért a továbbiakban csak ezekkel a típusokkal foglalkozok.

A gyors immuneszteszt immunkromatográfia elven működő „szendvics” rendszerű teszteszközök. A teszteszközök általában monoklonális ellenanyag alapúak. A membránt a vizsgálandó fehérje extraktumba kell mártani. A membrán adszorbens zónáján antigén-specifikus ellenanyaggal fedett, színezett mikroszemcsék találhatók. Ezek hozzákapszolódnak a mintában levő célfehérjéhez, komplexet alakítanak ki, majd összekapszolódva haladnak a reakciózóna felé. A reakciózóna egy pontján a kialakult immunkomplex antigén-specifikus ellenanyaghoz kapszolódik. Ha ez a folyamat lejátszódik, a mikroszemcse elszíneződik, ezzel jelezve a felhasználónak, hogy található-e a mintában allergén (pl. glutén) vagy sem (Takács, 2008).

ELISA módszer

A módszer antigén-ellenanyag kötődésen alapszik. A folyamat egy antigén kötőhelyeket tartalmazó szilárd fázison megy végbe. A komplex azonosítása enzimes jelöléssel történik. Az enzimhez szubsztrát kapszolódik, és ha megtörtént az immunkomplex létrejötte, akkor látványos és detektálható színreakció megy végbe. A szín

intenzitása egyenes arányban van a kialakult komplexek, és ezáltal a mintában található allergének mennyiségével. A színintenzitás mértéke ELISA fotométerrel detektálható.

ELISA módszeren belül többféle alaptípust különböztetünk meg:

- direkt ELISA
- indirekt ELISA
- kompetitív ELISA
- kettős ellenanyagú szendvics ELISA

Az ELISA módszereknél alkalmazott ellenanyagokat két csoportra bonthatók:

- Monoklonális ellenanyagok, melyekre az jellemző, hogy azonos specificitású ellenanyagmolekulákból állnak, egyetlen B sejtből származó sejtvonal termeli őket, egyetlen epitóp felismerésére képesek.
- Poliklonális ellenanyagok, melyek több, eltérő specificitású ellenanyag keveréke, több B sejt klón termékei, amelyek egy adott antigén eltérő epitópjait ismerik fel.

Jelenleg a Táplálkozástudományi és Különleges Táplálkozási Célú Codex Bizottsága (Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses szerint az élelmiszerekben és élelmiszeralkotókban található glutén kvantitatív kimutatására leghatásosabbak az immunológiai módszerek (Pl. ELISA).

Számos cikk beszámol arról, hogy az néhány minta esetében az ELISA mérések fals pozitív vagy fals negatív eredményt adtak. A különböző ellenanyagokon alapuló ELISA KIT-ek összehasonlítása során kiderült, hogy a mért prolamin tartalmak között nagy eltérések is lehetnek (Eckert et al., 2006). Az ellenanyag típusa befolyásolja a módszer érzékenységét. Ezt a III. táblázat is jól mutatja (Takács, 2008).

	Cég [*] /Kit név	Érzékenység gliadin (glutén) ppm
Poliklonális	ImmunoLab GmbH: Gluten ELISA Test	4 (8)
Monoklonális ω-gliadin specifikus	R-Biopharm: Ridascreen Gliadin Prolamin Munkacsoport által validált	1,5 (3)
	R-Biopharm: Ridascreen Fast Gliadin	5 (10)
	Tepnel: Gluten Assay kit AOAC validált	1 (2)
	Tepnel: Gluten Rapid Kit-gyorsteszt	(100-200)
	Diffchamb: Transia Plate-Gluten	5 (10)
Monoklonális R5- ellenanyagra alapozott	Diffchamb: Transia Plate-Prolamins Prolamin Munkacsoport által validált	1,5 (3)
	Operon: Stick Gluten	1,5 (3)
	Ingenasa: IngezimGluten (3.0.GLU.K.2)	1,5 (3)
	R-Biopharm Rida Quick Gliadin-gyorsteszt	2,5

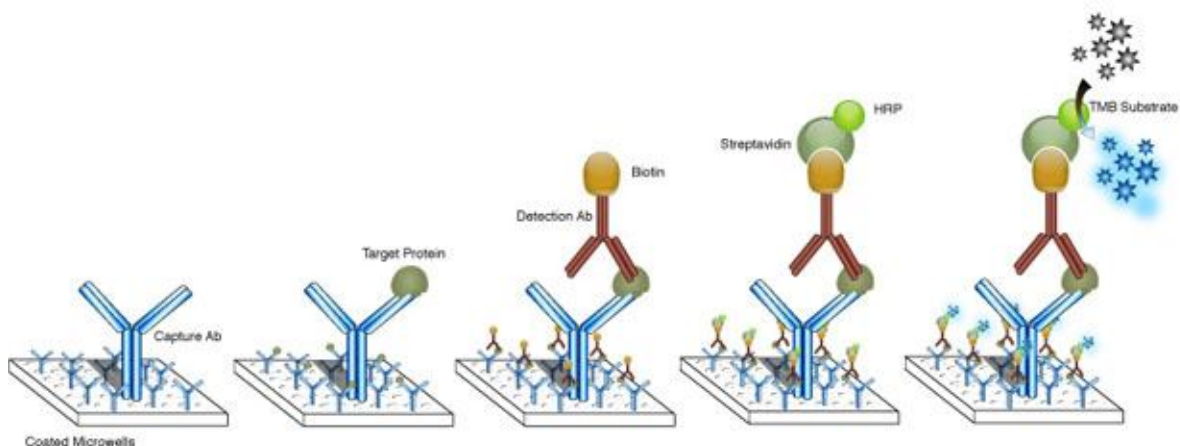
III.táblázat: Kereskedelmi forgalomban kapható, immunológiai módszeren alapuló glutén KIT-ek érzékenységének összehasonlítása (Takács, 2008)

A Codex Alimentarius Commission az R5 ellenanyagon alapuló szendvics ELISA módszert fogadta el hivatalos gluténmérési módszernek. Egy 2012-es cikk beszámol arról, hogy élelmiszer-feldolgozás során fragmentálódó, átalakuló glutén fehérjék peptidekre esnek szét, ezáltal a R5 szendvics ELISA által felismert epitópok között van, amelyik felismerhetetlenné válik, és ebben az esetben a mérés rossz eredményt ad. A probléma okán több módszerfejlesztés is indult. Egyik ilyen ígéretes fejlesztés egy új kompetitív R5 ELISA módszer kialakítása, mely sokkal alkalmasabb a gliadin mennyiségi meghatározására hidrolizált mintákban is (Mena et al., 2012). Mérési eltéréseket okozhat az is, hogy a glutén különböző fehérjefrakciói eltérően oldódnak a különböző oldószerekben. Ezen probléma kiküszöbölésére kifejlesztettek egy új két lépéses extrakciós protokollt, melynek lényege, hogy újszerűen kombinálja a gliadinok és gluteninek extrakcióját. Ennek eredményeképpen pontosabban és megbízhatóbban mérhető meg a

gluténfehérjék mennyisége (Broeck, America, Smulders, Bosch, Hamer, Gilisen, Meer, 2009). A gluténvizsgálatok egyik központi feladata, hogy képesek legyenek ne csak nagy, hanem egészen kis mennyiségű glutén kimutatására is. Ez azon élelmiszerek esetében fontos, melyek alapanyagainak természetesen nem kellene tartalmaznia glutént, azonban az alapanyagok szennyeződése miatt mégis kimutatható belőlük a toxikus molekula. Ilyen például a zab és abból készült termékek. Egy 2006-os kutatás kimutatta, hogy a zabtermékek egy részében árpaszennyezés mutatható ki. Méréstechnikai szempontból pedig azt állapították meg, hogy sem az R5 ellenanyagon alapuló, sem az GÖ-gliadin ellenanyagon alapuló módszer sem pontos. Vizsgálatuk eredménye azt mutatta, hogy az R5 módszer túlbecsülte, az GÖ-gliadin módszer pedig alulbecsülte a mintában ténylegesen megtalálható árpamennyiséget. Ezen vizsgálat így felhívta a figyelmet két dologra: először is, hogy oda kell figyelni a gluténmentes termékek szennyeződés vizsgálatára, másrészt pedig, hogy a jelenlegi módszerek nem teljesen megbízhatók, további fejlesztésekre van szükség (Kanerva, Sontag-Strohm, Röppy, Alho-Lehto, Salovaara, 2006). Ugyancsak a gluténszennyeződés problémájára mutat rá az Amerikai Diéteikus Szövetség egy kutatása. A kutatás során 22 természetesen gluténmentes terméket vizsgáltak meg, melyek nem voltak „gluténmentes” címkével ellátva. R5 szendvics ELISA módszer alkalmazásával azt az eredményt kapták, hogy a 22 mintából 7 a gluténmentességi határ (20 ppm) feletti mennyiségű gluténszennyeződést tartalmazott (Thomson, Lee, Grace, 2010). Korábbi vizsgálatok során kiderült, hogy a vizsgált minták gluténtartalom meghatározása során az ELISA módszerek különböző mértékben függenek a kalibrációt szolgáló referencia gluténtől (Eckert, Sharf, Wald, Pfannhauser, 1997). 2006-ban egy kutatócsoport kísérletet tett egy megbízhatóbb, egységesebb referencia gluténminta előállítására, melynek eredményeként előállították a PWG-gliadint, mely a referenciamintától elvárható összes fontos kritériumnak megfelel. Ezen kritériumok a következők: magas fehérjetartalom, oldékonyság, homogenitás, mérési stabilitás, jó reakcióképesség a különböző enzimes immunmódszerekkel, reprezentatív a karakterisztikáját tekintve (Eckert et al., 2006).

A szendvics ELISA alapjainak bemutatása

Az általam használt vizsgálati módszerek (TEPNEL, R5 ELISA) a szendvics ELISA modellen alapulnak. A modell működése 11. ábrán szemléletesen áttekinthető.



11. ábra: A szendvics ELISA működési alapsémája („Epitomics,” 2012)

A vizsgálat kiindulási pontja a mikrotitráló lap. Ez egy lemez, mely általában polisztirolból készül. A lemezen 96 db 300 µl-es mélyedés található 8x12-es elosztásban. A mélyedések felületén gyártó által felvitt immunológiai ellenanyag réteg található. Először bele kell juttatni a vizsgálandó mintákat a lemezen található mélyedésekbe, ami pipetta segítségével történik. Ha a minta tartalmazza az ellenanyagnak megfelelő antigéneket, akkor azok hozzá fognak kapcsolódni az ellenanyag réteghez. A kötődés után a felesleges molekulákat speciális mosóoldattal el kell távolítani, hogy a további reakciókat ne zavarják meg. Második lépésként újabb ellenanyag molekulák kerülnek fel a lemezre, melyek enzimmel vannak megjelölve. Ezek a molekulák szintén hozzákötődnek az antigénekhez. Ezáltal egy szendvicsforma alakul ki (mely névadója a modellnek), melyben középen található a keresett antigén, melyet két oldalról egy-egy antigénre specifikus ellenanyag molekula fog közre. A további reakciók célja, hogy a mintában található antigén jelenléte, valamint mennyisége mérőműszer számára detektálható legyen. Ehhez az elegyhez megfelelő szubsztrátot kell hozzáadni. A másodsorra felvitt ellenanyag molekulákhoz kapcsolt enzimejéhez (pl. biotin) hozzákapszódik a szubsztrát, melynek színreakció mellett lezajló szubsztrát-átalakulás lesz a következménye. A színreakció szabad szemmel is érzékelhető. A színreakció intenzitása egyenesen arányos a mintában található antigén mennyiségével: minél sötétebb a minta színe, annál több

antigén található benne. Az intenzitás mértéke spektrofotométerrel ellátott ELISA leolvasóban detektálható. (Takács Krisztina)

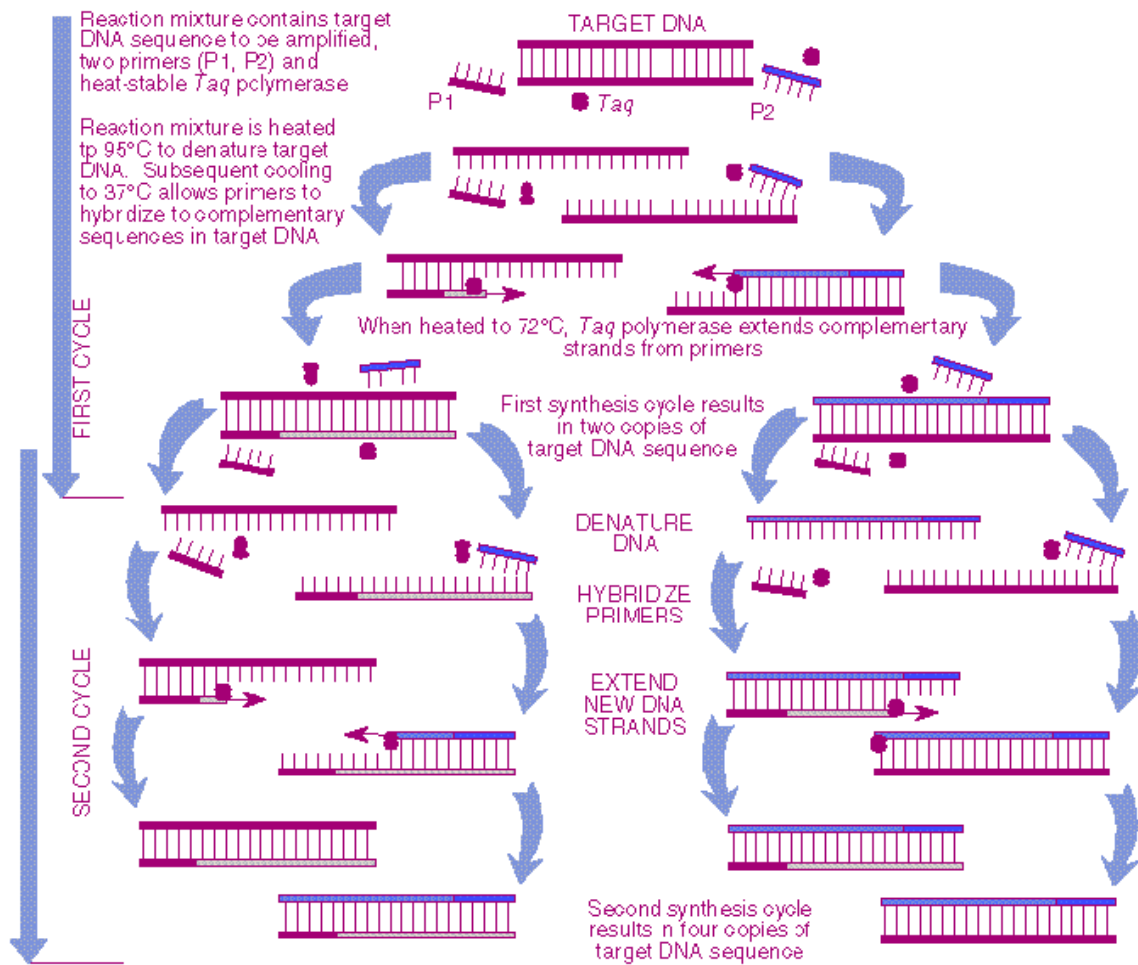
2.4.7 Polimeráz-lánreakció (PCR)

Az ELISA módszereknek, mint minden módszernek, azonban vannak korlátai. Ilyen korlát például, hogy mekkora az a legkisebb mennyiség, amit képes kimutatni. Ezt nevezik a módszer érzékenységének. A korábbiakban bemutatott táblázatban látható, hogy eltérő módszereknek eltérő az érzékenysége. Bizonyos esetekben viszont fontos lenne, hogy ezen érzékenységi határ alatti mennyiséget is ki lehessen mutatni. 2011-ben született egy publikáció, melyben arról számolnak be, hogy kifejlesztettek egy real-time PCR módszert, mely alkalmas az ELISA módszerek érzékenységi határa alatti (ez a kritikus érték a 1,5 mg/kg) gluténmennyiséget is kimutatni (Mujico, Lombardia, Mena, Méndez, Albar, 2011). Így kijelenthetjük, hogy a gluténmérés nem immunológiai alternatívájaként tekinthetünk a PCR módszerre. A Codex Alimentarius Commission is elfogadta ezt a módszert, és alternatívaként javasolja glutén kimutatására.

A PCR technika célja, hogy egy adott DNS szakaszt olyan nagy mennyiségben szaporítson fel, hogy az megfelelően vizsgálható legyen. A PCR alapvető működési mechanizmusa a 12. ábrán látható. A folyamathoz sokszorosítani kívánt DNS szakaszra, egy rövid oligonukleotid párra, polimeráz enzimre, dezoxinukleotidokra van szükség. A sokszorosítás után a fehérjéket gélelektorforetikus módszerrel el lehet különíteni, majd festési eljárással láthatóvá tehetők (Némedi, Ujhelyi, Gelencsér, 2007).

A Mujicoék által alkalmazott real-time PCR abban különbözik az alap PCR eljárástól, hogy a polimeráz lánreakció során végbemenő DNS sokszorozódás speciális festékek és próbák által nyomon követhetővé válik. A festékek által emittált fluouresszencia detektálható, és arányos a folyamat során keletkezett szekvenciák aktuális mennyiségével.

DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction



Source: *DNA Science*, see Fig. 13.

12.ábra: A PCR alapvető működési mechanizmusa („DNA Amplification,”2012)

Az olvasott cikkek és a hivatalos ajánlások alapján kijelenthető, hogy a glutén kimutatására jelenleg az ELISA és PCR módszerek a legalkalmasabbak.

3. A gluténszennyezettség önálló vizsgálata

3.1 A kutatás célkitűzése:

- Természetesen gluténmentes és zabtermékek gluténszennyezettségének vizsgálata.
- Különleges táplálkozási célra készült gluténmentes élelmiszerek, valamint biotermékek gluténszennyezettségének vizsgálata.
- A glutén kimutatására használatos két módszer (Tepnel, R5) összehasonlítása.

3.2 A vizsgálat tárgya

Vizsgálatom két fő részből áll. Az első rész tárgya a természetesen gluténmentes élelmiszerek gluténszennyezettsége. Ezen belül vizsgálok kereskedelmi forgalomban kapható természetesen gluténmentes liszteket, kifejezetten zabból készült termékeket. A vizsgálatba bevontam gluténmentes sütőkeverékeket és biotermékeket is. A második rész tárgya kettő, jelenleg leggyakrabban alkalmazott, gluténtartalom megállapítására alkalmas mérési módszer összehasonlítása. Az egyik G γ -gliadin antitesten, a másik pedig R5 antitesten alapuló módszer.

3.3 Hipotézisek:

- Feltételezem, hogy a természetesen gluténmentes termékek határérték alatti gluténmennyiséget tartalmaznak.
- A természetesen gluténmentes és zab alapanyagú élelmiszerekről feltételezem, hogy a betakarítás, szállítás, raktározás és feldolgozás során szennyeződnek gluténnel.
- A felhasznált két módszer (Tepnel és R5) mérési eredményei megegyeznek
- A biotermékek nem szennyeződnek gluténnel a különleges termesztési módnak köszönhetően.

A TEPNEL és R5 ELISA módszerek szendvics ELISA módszeren alapulnak. Mindkét módszernek megvannak a sajátosságai, továbbá módszertani lépésekben is vannak eltérések. A következő alfejezetekben részletesen bemutatom őket.

3.4 G-gliadin meghatározására alkalmas módszer bemutatása

Ez a módszer monoklonális ellenanyagon alapuló, G-gliadin kimutatására alkalmas eljárás. A mikroplate-en található gyári ellenanyag az G-gliadinhoz képes specifikusan kötődni. A módszer jól alkalmazható hőkezelt mintákon is, ugyanis az G-gliadin nem roncsolódik hő hatására, így kimutatásra alkalmas. Típusát tekintve direkt szendvics ELISA módszer. Ez egyrészt azt jelenti, hogy a keresett antigént két ellenanyag molekula fogja közre a specifikus immunológiai kapcsolódások következtében. A „direkt” kifejezés pedig arra utal, hogy az antigén vagy az ellenanyag jelölve van, és a jelzett komponens kötődésének mértéke arányos a másik komponens mennyiségével. A keresett antigén minőségi és mennyiségi meghatározása színreakció intenzitás detektálásával állapítható meg. A detektálás abszorbancia mérésre alkalmas Thermo Scientific Multiscan FC Elisa leolvasóval történik.

A módszer érzékenysége 1 ppm glutén, ami azt jelenti, hogy a legkisebb mennyiségű glutén, amit a mintában képes kimutatni az 1 ppm. Ez alatti mennyiség kimutatására nem alkalmas. Mérési tartománya 3-50 ppm közé esik. Felhasználható glutén kimutatására, árpa maláta hamisítás kimutatására, valamint kenyérbúza kimutatására durumtészta-ban. Keresztreakciót mutat búzával 100%-ban, rozssal 120%-ban, durummal 50%-ban, árpával 5 %-ban. A módszer előnye, hogy hőkezelt mintákból is képes a glutén G-gliadin frakcióját kimutatni. Kapacitását tekintve használható 96 minta vizsgálatára (ami tartalmazza a standardokat, kontrollt és a mintákat, párhuzamosokat).

Módszertanát tekintve 3 fő részre oszthatjuk fel ezt a glutén kimutatási módszert:

1. Minták előkészítése
2. Minták felvitele a mikroplate-re és megfelelő reagensek hozzáadása
3. Az eredmény detektálása és számolás

A minták előkészítése

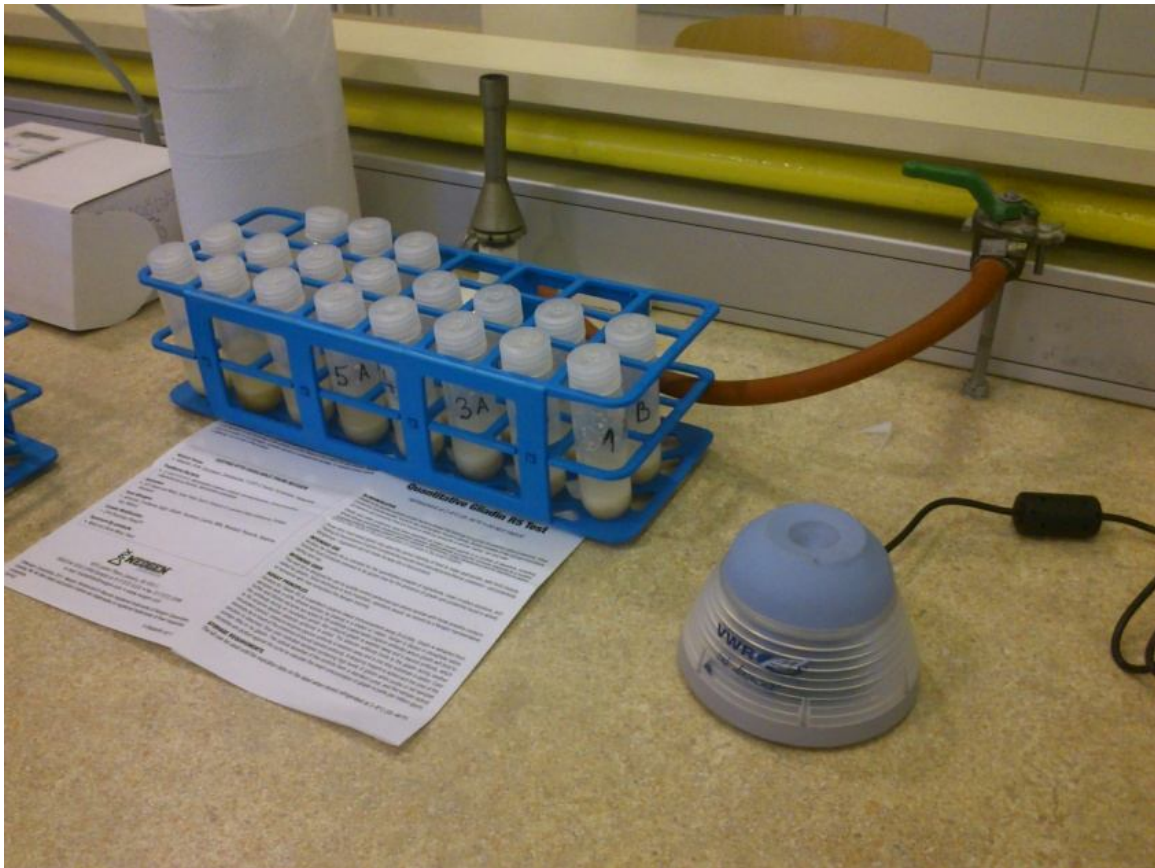
Az előkészítés nulladik lépéseként előkészítettem minden szükséges vegyszert és eszközt, ami az előkészítő műveletek során szükségesek lehetnek. Továbbá feliratoztam a mintákat és elterveztem hány párhuzamossal fogok dolgozni. Az előkészítés során az alábbi anyagokat, eszközöket használtam:

- a TEPNEL KIT-ben található extrakciós por, hígító folyadék
- desztillált víz, etanol
- kereskedelmi forgalomban vásárolt minták
- analitikai mérleg, főzőpohár, kémcső, mérő kanál
- centrifuga, centrifuga csövek,
- homogenizátor készülék, vortex kémcsőkeverő

A vizsgálandó mintákból analitikai mérleg segítségével 2-2 g mennyiséget kimértem, majd megszámozott centrifuga csövekbe helyeztem bele. Ezt úgy oldottam meg, hogy főzőpohárba beletettem a centrifugacsövet, ezt letáraztam a mérlegen és ebbe mértem bele a szükséges mennyiséget. Minden mintából 2 – 2 centrifugacsőbe mértem be. Az egyes csöveket megfelelő jelöléssel láttam el (pl. 2A, 8B, 14A). Minden mintát külön, tiszta kanállal mértem be, hogy az esetleges keresztszennyezést elkerüljem. Ezt követően elkészítettem az extrakciós oldatot, melynek az a szerepe, hogy a glutént kiszabadítsa a magszemek vagy azok őrleményének mátrixából. A KIT-ben található extrakciós por fel lett oldva 600 ml desztillált vízben, majd 400 ml etanol lett hozzáadva. A kimért mintákhoz 20-20 ml extrakciós oldat került hozzáadásra. Az így keletkezett elegyeket 1,5 percig vortex segítségével homogenizáltam. A centrifugacsöveket nyolcasával centrifugába helyeztem, és 10 percig 5000x sebességen lecentrifugáltam (13. ábra).



13.ábra: Centrifuga a mintákat tartalmazó centrifugacsövekkel

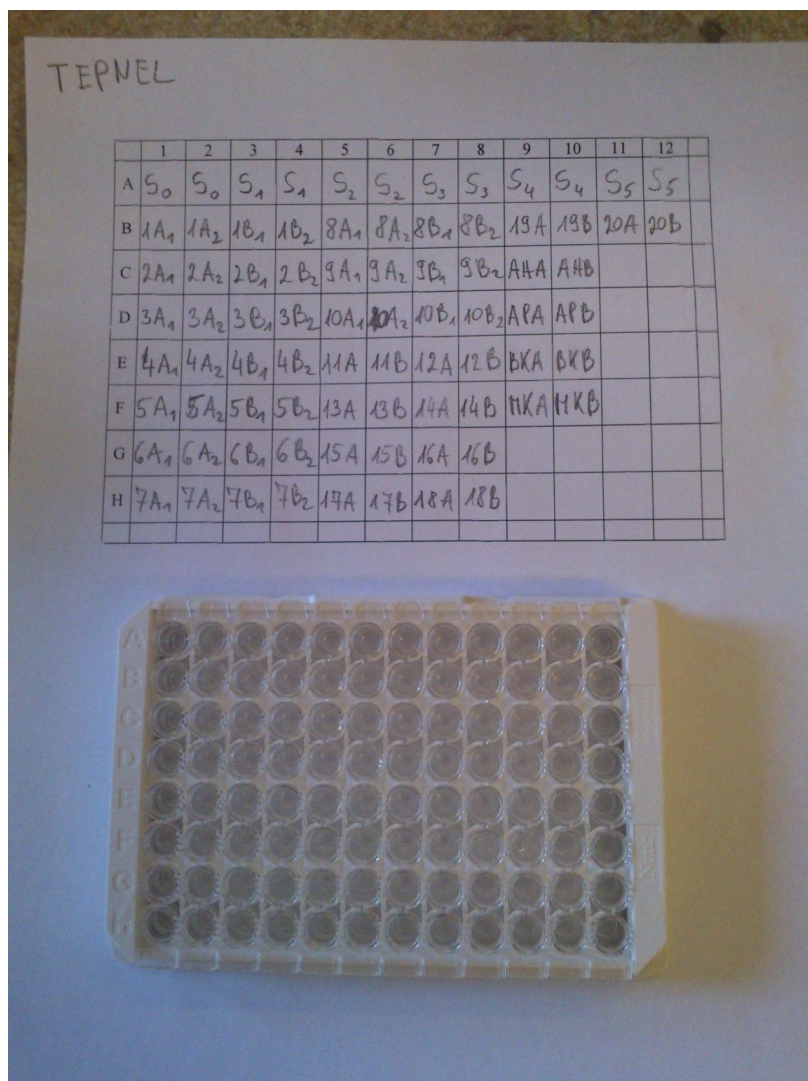


14.ábra: A kémcsőkeverő készülék (jobbra) és a mintákat tartalmazó számozott centrifugacsövek (balra)

A felülúszót 50-szeresére hígítottam az alábbiak szerint: 10 μ l felülúszót átpipettáztam kis kémcsövekbe, majd 490 μ l hígító folyadékot hozzámértem. Itt fontos volt odafigyelni, hogy melyik mintából hány párhuzamost készítek. Ha 2 párhuzamos készült, akkor a kis kémcsöveket így jelöltem: 1A 1B. Ha 4 párhuzamos készült, akkor a következő módon változott a jelölés: 1A1, 1A2, 1B1, 1B2. Végül pedig az összes kémcső vortex keverővel (14. ábra) homogenizálásra került. Az előkészített minták 12 órára hűtőbe kerültek a vizsgálat következő fázisának elkezdéséig.

Minták felvitele a mikroplate-re és megfelelő reagensek hozzáadása

Először elkészítettem a mikroplate alaprajzát (15. ábra), melyen bejelöltem, hogy mely mintát mely mélyedésbe fogok belepipettázni, valamint meghatároztam a standardok helyét.



15.ábra: A TEPNEL módszerhez alkalmazott microplate és alaprajza

A TEPNEL KIT az alábbiakat tartalmazza:

- extrakciós por, hígító folyadék
- 5 db standard a kalibrációhoz (3 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm glutén)
- 1 db ellenanyaggal bevont mikroplate
- mosófolyadék
- antigliadin peroxidáz konjugátum
- TMB szubsztrát
- STOP solution folyadék

A hígító oldatot, mint vakot és KIT-ben kapott 5 db standardot 2-2 párhuzamosban vittem fel a lemezre 100-100 µl mennyiségben. A korábban előkészített, 50-szeresre hígított mintákból 100-100 µl-t pipettáztam a mikroplate-re. A lemezt 25 ° C-on 60 percig rázó készülékkel homogenizáltam.

Ezen idő alatt az antigén molekulák hozzákapcsolódtak az ellenanyag molekulákhoz. A felesleges molekulákat és folyadékot kiöntöttem a csapba. A lemezt 3-szor kimostam csapvízzel, majd pedig 300 µl-es 8 ágú pipetta segítségével mosófolyadékkal 3-szor átmostam a lemezt. A továbbiakban végig a 8 ágú pipettát alkalmaztam. Következő lépésben 100 µl konjugátumot (anti gliadin peroxidáz) pipettáztam bele a mélyedésekbe. Ezt követte 30 perces 25 ° C-on történő rázás. Az idő leteltével újból lemostam a lemezt 3x csapvízzel, 3x mosófolyadékkal. Ezt követte 100 µl TMB szubsztrát felvitele a lemezre. Rázás és mosás nélküli 30 perc várakozás után utolsó lépésként belepipettáztam a mélyedéseként 50-50 µl STOP solution reagenst, mely leállította az addig zajló kromatogén folyamatokat.

Az eredmény detektálása és számolás

A színreakciók intenzitását spektrofotométerrel ellátott Thermo Scientific Multiscan FC Elisa leolvasóval detektáltam. A kapott eredményeket a leolvasó saját programjában vettem össze, felhasználva a standardok alapján felállított kalibrációs egyenest, valamint a szükséges számításokat a Microsoft Excel programban végeztem. Az eredmények statisztikai értékeléséhez kétmintás t-próbát alkalmaztam.

3.5 Az R5 módszer bemutatása

Az R5 ELISA módszer monoklonális R5 ellenanyagon alapuló, gliadin-epitópok felismerésére alkalmas eljárás. (Az epitópok a fehérjemolekulának azon részei, melyek a specifikus antitestekhez tudnak kapcsolódni.) A mikroplate-en található gyári ellenanyag az GØ szekalin ellen termeltetett R5 ellenanyag. Típusát tekintve direkt szendvics ELISA módszer. Ez egyrészt azt jelenti, hogy a keresett antigént két ellenanyag molekula fogja közre a specifikus immunológiai kapcsolódások következtében. A „direkt” kifejezés pedig arra utal, hogy az antigén vagy az ellenanyag jelölve van, és a jelzett komponens kötődésének mértéke arányos a másik komponens mennyiségével. A keresett antigén minőségi és mennyiségi meghatározása színreakció intenzitás detektálásával állapítható

meg. A detektálás abszorbancia mérésére alkalmas Thermo Scientific Multiscan FC Elisa leolvasóval történik.

A módszer érzékenysége 2,5 ppm glutén, ami azt jelenti, hogy a legkisebb mennyiségű glutén, amit a mintában képes kimutatni az 2,5 ppm. Ez alatti mennyiség kimutatására nem alkalmas. Mérési tartománya 2,5 - 40 ppm közé esik. Képes felismerni gliadinokat (búza), hordeineket (árpa), szekalinokat (rozs) egyforma mértékben. A módszer erőssége, hogy főleg alfa, gamma típusú toxikus gliandin-epitópokat képes kimutatni. Kapacitását tekintve csak 48 minta vizsgálatára alkalmas (ami tartalmazza a standardokat, kontrollt és a mintákat, párhuzamosokat).

Módszertanát tekintve 3 fő részre oszthatjuk fel ezt a glutén kimutatási módszert:

1. Minták előkészítése
2. Minták felvitele a mikroplate-re és megfelelő reagensek hozzáadása
3. Az eredmény detektálása és számolás

A minták előkészítése

Az előkészítés nulladik lépéseként előkészítettem minden szükséges vegyszert és eszközt, ami az előkészítő műveletek során szükségesek lehetnek. Továbbá feliratoztam a mintákat és elterveztem hány párhuzamossal fogok dolgozni.

Az előkészítés során az alábbi anyagokat, eszközöket használtam:

- a R5 ELISA KIT-ben található PBS (SampleDilution Solution), extraction additive por
- desztillált víz, 60%-os alkohol
- kereskedelmi forgalomban vásárolt minták
- analitikai mérleg, főzőpohár, kémcső, mérőkanál
- centrifuga, centrifuga csövek
- vortex kémcsőkeverő
- homogenizátor készülék

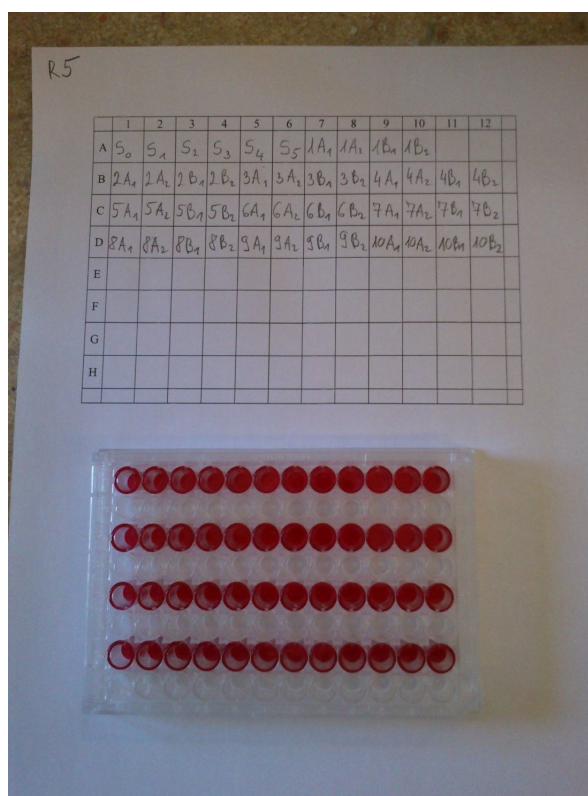
A vizsgálandó mintákból analitikai mérleg segítségével 1-1 g mennyiséget kimértem, majd megszámozott centrifugacsövekbe helyeztem bele. Ezt úgy oldottam meg, hogy főzőpohárba beletettem a centrifugacsövet, ezt letáráztam a mérlegen és ebbe mértem bele a szükséges mennyiséget. Minden mintából 2 – 2 centrifugacsőbe mértem be. Az egyes

csöveket megfelelő jelöléssel láttam el (pl. 2A, 8B, 14A). Minden mintát külön, tiszta kanállal mértem be, hogy az esetleges keresztszennyezést elkerüljem.

Ezt követően elkészítetem az PBS oldatot. A KIT-ben található PBS por fel lett oldva 1 liter desztillált vízben. A kimért mintákhoz 1-1 mérőkanál extraction additive, valamint 10-10 ml 60%-os etanol került hozzáadásra. Az így keletkezett elegyeket 11 percig vortex segítségével homogenizáltam. A centrifugacsöveket nyolcasával centrifugába helyeztem és 10 percig 2500 rpm-en lecentrifugáltam. A felülúszóból 100 µl mintát 4,9 ml PBS oldattal fel kellett hígítani a megfelelően besorszámozott kémcsövekbe. R5 ELISA esetében mindig 4 párhuzamost készítettem, ennek megfelelően végeztem a jelölést is (pl 7A1, 7A2, 7B1, 7B2). Az előkészítés utolsó lépéseként minden kémcsövet 30 másodpercig megkevertem kémcsőkeverővel, és a mintákat 12 órára a hűtőbe helyeztem a vizsgálat következő fázisának elkezdéséig.

Minták felvitele a mikroplate-re és megfelelő reagensek hozzáadása

Először elkészítetem a mikroplate alaprajzát (16. ábra), melyen bejelöltem, hogy mely mintát mely mélyedésbe fogok belepipettázni, valamint meghatároztam a standardok helyét.



16.ábra: Az R5 módszerhez alkalmazott microplate és alaprajza

Az R5 ELISA KIT az alábbiakat tartalmazza:

- 4 vörös és 4 átlátszó tálcacsík
(48 antitesttel ellátott mélyedés)
- mikroplate keret
- 6 db standard (0 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm)
- mosó puffer oldat
- konjugátum
- K-blue szubsztrát
- RED STOP solution oldat

Az R5 mikroplate eltér a TEPNEL módszer során alkalmazott mikroplate-től. A 16. ábrán jól látható, hogy a lemezen 4 vörös és 4 átlátszó sor található. A vörös mélyedésekben található a specifikus ellenanyag. Az előkészített mintákból, valamint a R5 KIT-hez tartozó 5 féle standardból 150-150 μ l-t bele mértem a vörös jelzéses tálcacsíkokba. Következő lépésben a vörös jelzésű tálcacsíkokból átpipettáztam 100-100 μ l mennyiséget 12 ágú pipetta segítségével az átlátszó tálcacsíkokba. 20 másodpercig az asztal sík felületén óvatosan, kézzel, körkörös mozdulatokkal kevergettem a tálca tartalmát, majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. A mikroplate-keretből a vörös jelzésű csíkokat eltávolítottam, mert a továbbiakban már nem volt rájuk szükségem. A várakozási idő letele után mosó puffer oldattal 5 x kimostam a tálca lyukacskaít (17.ábra).



17.ábra: Microplate-lemez és az R5-ös mosófolyadék

Ennek magyarázata, hogy el kellett távolítani azokat a molekulákat, folyadékmennyiséget a lyukacsokból, melyek nem kötődtek hozzá az antitestekhez. Ugyanis ha nem elég alapos a mosás, akkor visszamaradó felesleges molekulák megzavarhatják a további reakciókat. Alapos mosás után 12 ágú pipettával felvittem minden mélyedésbe 100 μ l konjugátumot. (A további beméréseknél már csak a 12 ágú pipettát használtam.) Ezt követte 20 másodperc körkörös rázogató és 10 perces szobahőn történő inkubálás. Újbóli 5-szörös mosás után 100 - 100 μ l K-blue szubsztrátot mértem bele a mélyedésekbe. Ezt a lépést is 20 perc körkörös kevergetés és 10 perc szobahőn történő inkubálás követte. A reagensek sorában utoljára a RED STOP solution oldatot vittem fel a lemezre, mélyedésenként 100 – 100 μ l-t. Ez leállította az addig zajló kromatogén folyamatokat. Utoljára még 20 másodpercig kevergettem a tálca tartalmát körkörös mozdulatokkal.

Az eredmény detektálása és számolás

A színreakciók intenzitását spektrofotométerrel ellátott Thermo Scientific Multiscan FC Elisa leolvasóval (18. ábra) detektáltam 620 nm-en. A kapott eredményeket a leolvasó saját programjában vettem össze, felhasználva a standardok alapján felállított kalibrációs egyenest, valamint a szükséges számításokat a Microsoft Excel programban végeztem. Az eredmények statisztikai értékeléséhez kétmintás t-próbát alkalmaztam.



18.ábra: Thermo Scientific Multiscan FC Elisa leolvasó

3.6 Mintavétel bemutatása, mintaleírás

A vizsgálatomhoz olyan termékeket választottam, amelyek gluténmentesek, többségében természetesen gluténmentes termékek. Azért választottam ezen termékcsoportot, mert a lisztérzékenyek számára ez az egyik potenciálisan vásárolt termékcsoport, és számukra kifejezetten fontos kérdés, hogy ezen termékek tartalmazzak-e glutént és ha igen, milyen mennyiségben.

A vizsgált minták kereskedelmi forgalomban kapható, természetesen gluténmentes élelmiszer alapanyagok (19. ábra). A mintákat különböző boltokból szereztem be, többféle gyártótól. A fő termékcsoportokat a IV. táblázatban tüntettem fel. Ügyeltem arra, hogy minél több mintát tudjak vizsgálni, és hogy a mintavétel ne csak egy gyártó termékeire korlátozódjon, mert az az összes adat feldolgozása után téves megállapításokat eredményezhet és torzíthatja a valóságot.

zabpehely	barna rizsliszt	kenyársütő keverék
zabkorpa	rizsliszt	kalács sütőkeverék
zabpehely liszt	kölesliszt	kenyérliszt
zabital	csicseriborsó liszt	
	kukoricadara	
	hajdina liszt	
	sárgaborsó liszt	
	kukoricaliszt	

IV.táblázat: Gluténszennyezettség szempontjából megvizsgált élelmiszerek

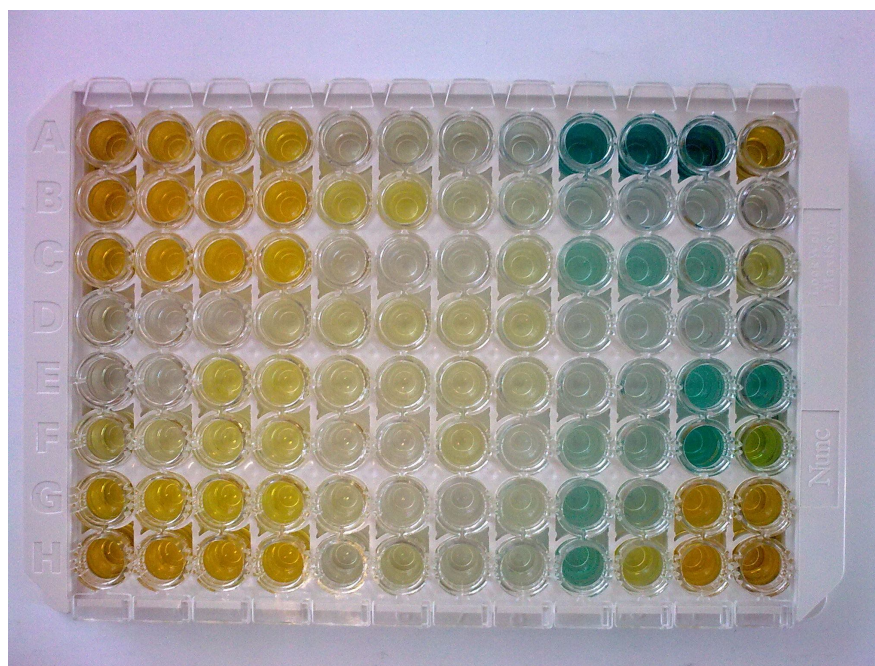


19.ábra: A vizsgálathoz használt kereskedelmi forgalomban vásárolt élelmiszerek

4. EREDMÉNYEK

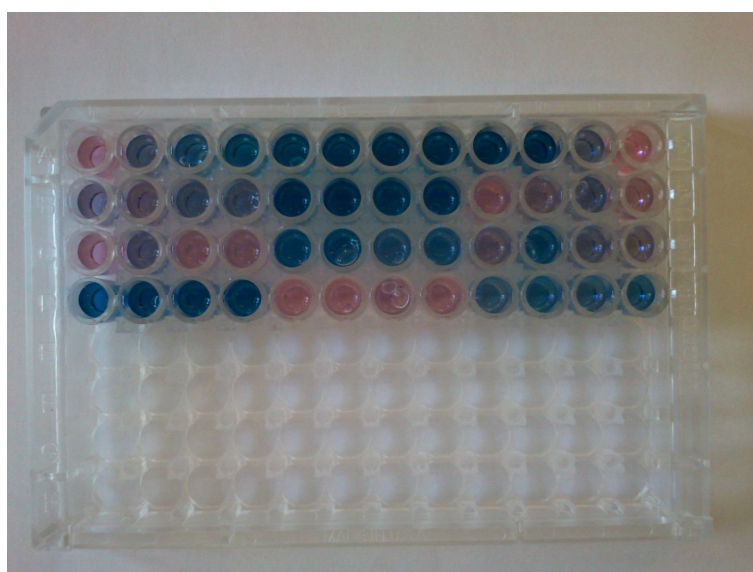
4.1 Színváltozások a mikroplate-lemezen

A microplate-lemezen mind a TEPNEL, mind az R5 módszer esetében, az alábbi ábrákon jól láthatóan, a minták színének változása tapasztalható. A TEPNEL módszer (20. ábra) esetében a minták a színreakció elején kék színűek voltak, majd a színreakciók teljes lejátszódása után sárga színűvé váltak. A színintenzitás különbsége szabad szemmel is jól érzékelhető. A képen azon mélyedésekbe, melyek kék színűek, még nem került bele a STOP solution reagens. Amelyekbe viszont igen, azok szép sárga színűek lettek. A számítógépes leolvasás után azt a megállapítást tehetem, hogy azon minták, melyek mérhető mennyiségű glutént tartalmaznak, azok sárga színűek. Minél több a glutén, annál sötétebb sárga szín árnyalata. Azon minták, melyek nem színesek, azok gluténmentesek vagy méréstartomány alatti gluténmennyiséget tartalmaznak.



20.ábra: TEPNEL microplate a színreakciók lezajlása közben

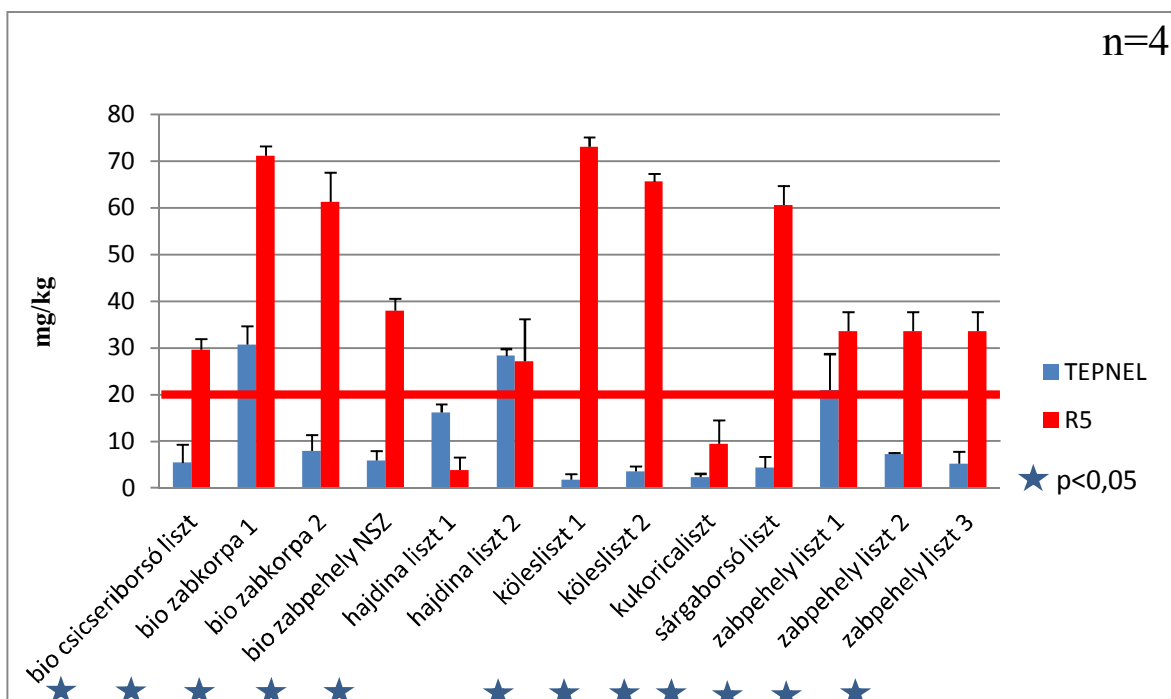
Az R5 módszer esetében (21. ábra) a STOP reagens mintákhoz adása előtt kék színűek voltak a minták, majd a hozzá mérés után a minták egy része rózsaszínű lett, egy részük pedig kék maradt. A számítógépes leolvasás után az eredmények és a minták színét összevetve arra a megállapításra jutottam, hogy azon minták, melyek mérhető mennyiségű glutént tartalmaznak, azok kék színűek. A színreakció végén rózsaszín minták kis vagy méréstartomány alatti mennyiségű glutént tartalmaznak.



21.ábra: R5 microplate a színreakciók lezajlása után

4.2 TEPNEL és R5 módszerek összehasonlítása

A 1. diagramon azon minták eredményei szerepelnek, melyeket megmértem mindkét módszerrel. A mért eredményeket és hozzájuk tartozó számolt értékeket (szórás és p érték) az 1.sz és 2.sz melléklet tartalmazza táblázatos formában.



1.diagram: Tepnel és R5 módszerek összehasonlítása

A diagramon azokat a mintákat és hozzájuk tartozó gluténtartalmat ábrázoltam, melyeket R5 és TEPNEL módszerrel is megmértem. Piros oszlopok jelzik az R5, kék oszlopok a TEPNEL mérés eredményeit. Látható, hogy a piros oszlopok kettő kivétellel (hajdinaliszt 1, hajdinaliszt 2) mind magasabbak, mint a kékek, pedig ugyanazt a mintát jellemzik. Ezek a magasságkülönbségek eltérő nagyságúak. A zabpehely liszt 1 esetében másfélszeres, a bio zabkorpa 2 esetében már hatszoros különbség is megfigyelhető. A köleslisztekénél a TEPNEL módszerrel 5 mg/kg alatti értéket detektáltam, míg R5 módszerrel 60-70 mg/kg értékeket kaptam eredményül. Az EU-s jogszabályozás alapján 2012. január 1-től gluténmentesnek azon termékek nevezhetők, melyek gluténtartalma 20 mg/kg alatt van. Ezt a határértéket piros vonallal jelöltem. Az általam vizsgált minták természetesen gluténmentes termékekből származnak. A TEPNEL módszerrel történt mérés eredményei alapján 3 minta az, ami meghaladta ezt a határértéket. Az R5 mérés eredményei nagyon elütnek a TEPNEL értékétől. A piros oszlop alapján a hajdinaliszt 1, hajdinaliszt 2, kukoricaliszt kivételével az össze minta gluténtartalma meghaladja (többszörösen is) a 20 mg/kg határértéket. Ezek alapján azt állapítom meg, hogy a két módszer mérési eredményei eltérnek egymástól olyan mértékben, hogy a különbség már gluténtartalmi kategóriaátlépést is eredményez. Ugyanis 20 mg/kg alatt „gluténmentes”, 20-100 mg/kg között már csak „nagyon alacsony gluténtartalmú” kategóriáról beszélhetünk, ami bizonyos lisztérzékeny betegek számára már nem tolerálható. Az eredmények közötti különbség jól látható az oszlopdiaagramon. A csillaggal jelölt mintáknál a két módszer mérési eredményei között szignifikáns különbség van. Ezt Student-féle kétmintás T-próbával állapítottam meg. A T-próba konkrét eredményei a 2.sz. mellékletben olvashatók.

Gluténszennyezettség mértéke természetesen gluténmentes vagy különleges táplálkozási célra készített termékekben

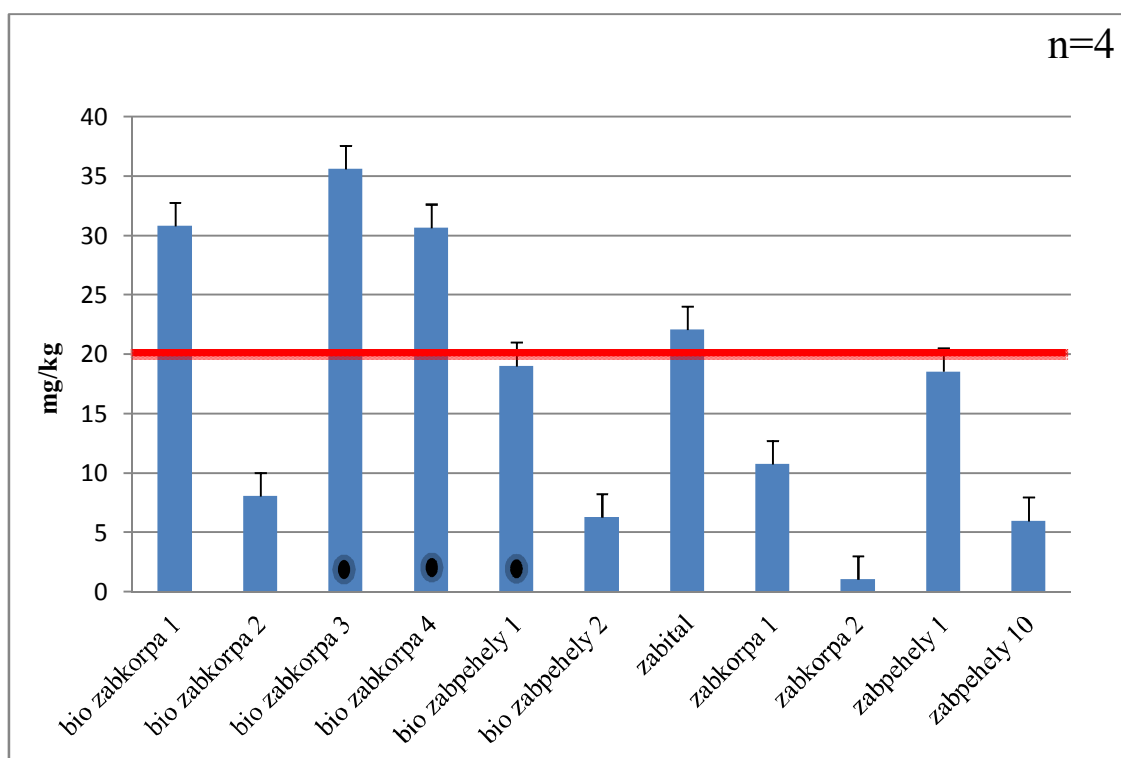
A kapott eredményeket több szempont szerint csoportosítottam és ábrázoltam. A mérési eredményeket és számolt értékeket a 3,4,5 számú mellékletek tartalmazzák táblázatos formában. A következő csoportokat alakítottam ki:

- zabtermékek
- lisztek
- különleges táplálkozási célú élelmiszerek
- biotermékek.

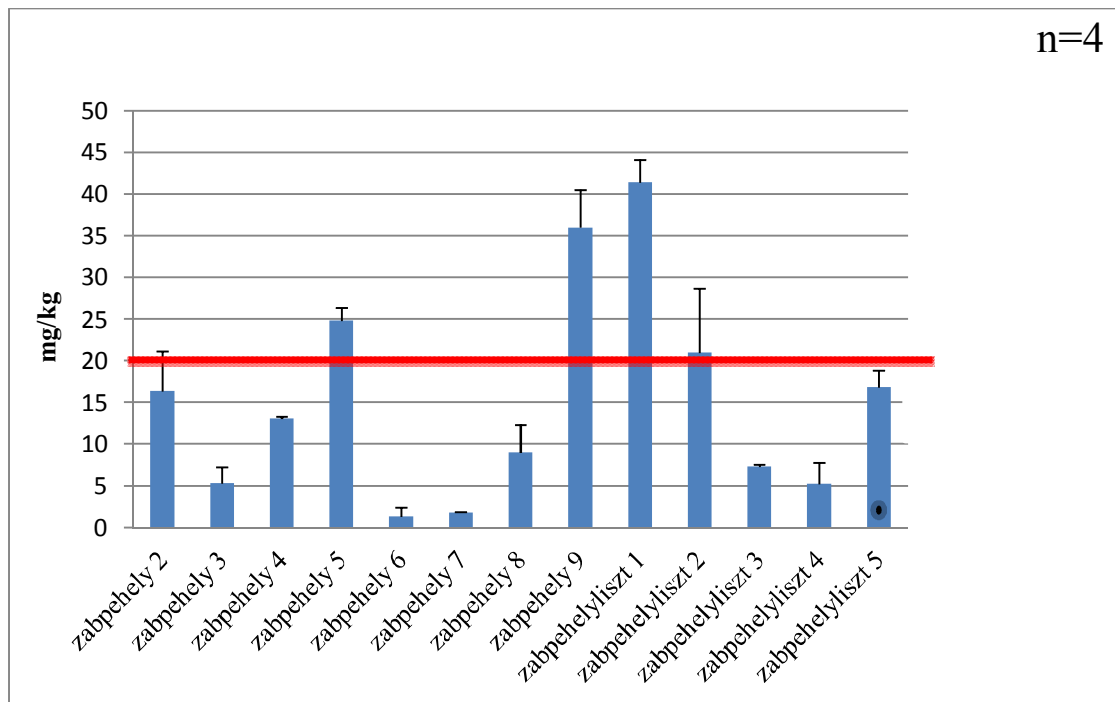
A minták többségét TEPNEL módszerrel mértem meg, ezeket kék oszlopok jelölik. Azokat a mintákat, melyek az R5 módszerrel lettek megmérve, olyan kék oszlopok jelölik, melyekben fekete kör van.

4.3 Zabtermékek gluténszennyezettsége

Ebbe a csoportba csak olyan termékek kerültek, melyek zab alapanyagúak. Az 2. diagramon zabkorpa, zabpehely és zabital minták eredményei láthatók. A kritikus 20 mg/kg határértéket négy termék (bio zabkorpa 1, 3, 4, és a zabital) gluténszennyezettsége haladja meg.



2. diagram: Gluténszennyeztség zabtermékekben I.

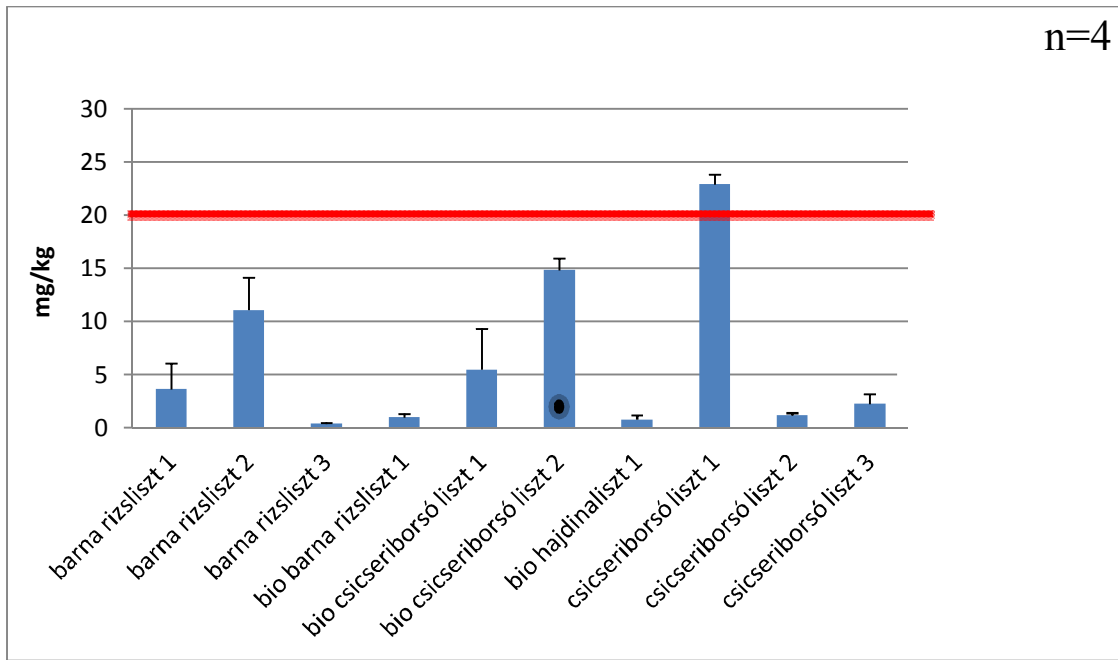


3.diagram: Gluténszennyezettség zabtermékekben II.

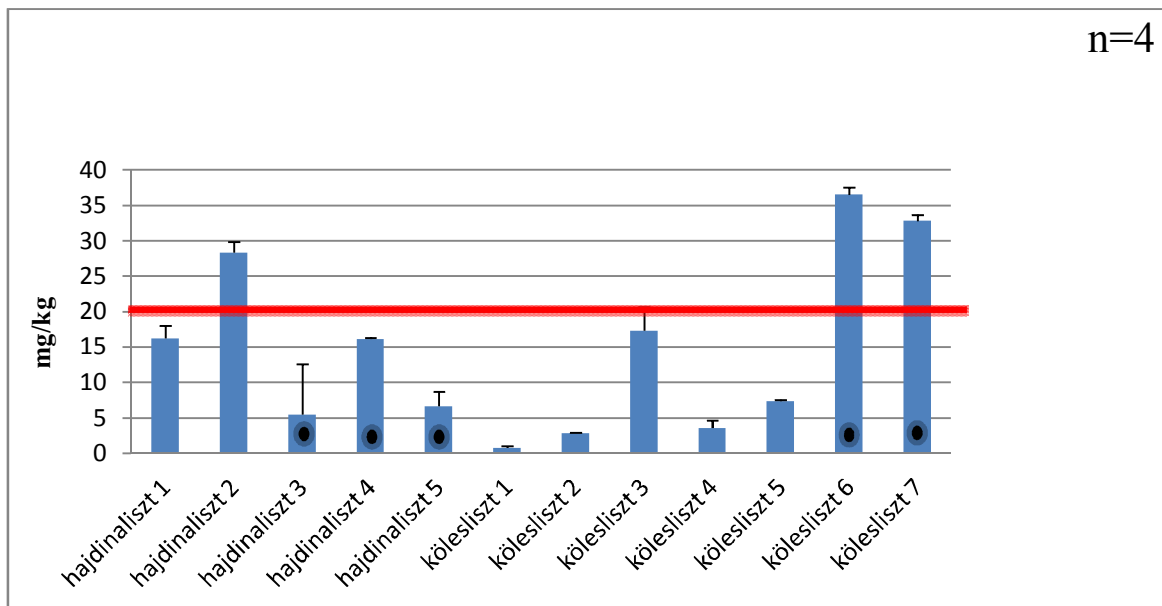
A 3. diagramon különféle zabpehelyek és azokból készült lisztek kerültek ábrázolásra. Ezek közül négy minta (zabpehely 5, 9 és a zabpehelyliszt 1,2) haladja meg a kritikus határértéket.

4.4 Lisztek gluténszennyezettsége

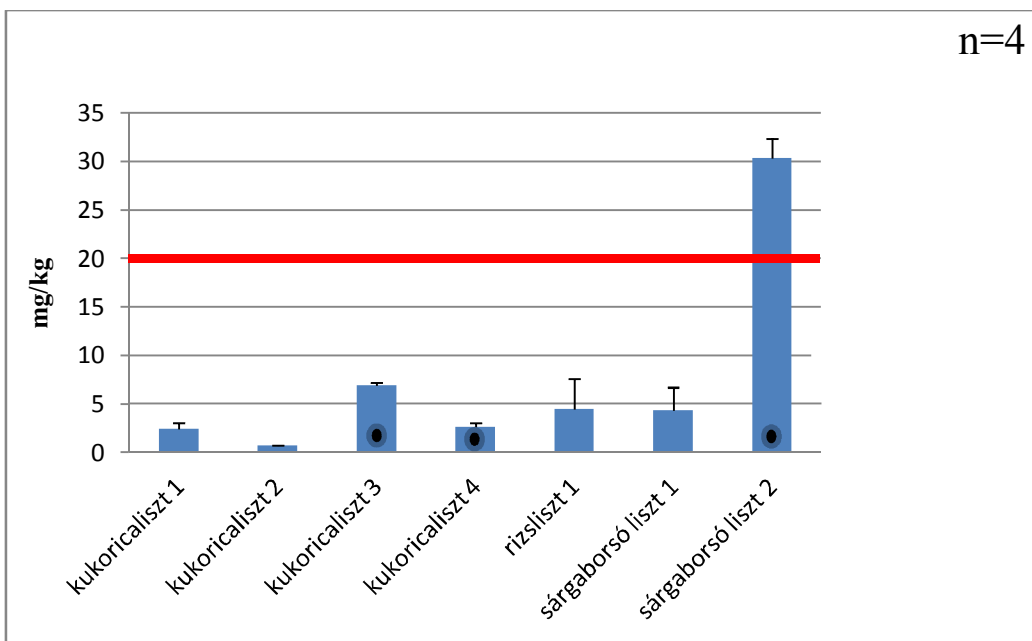
Ebbe a csoportba különböző természetesen gluténmentes növények terméséből készült liszteket soroltam. A feltüntetett 29 mintából (4, 5, 6 számú diagramokon ábrázolva) 5 esetében (csicseriborsó liszt 1, hajdinaliszt 2, kölesliszt 6,7 és sárgaborsó liszt 2) haladta meg a gluténszennyezettség a kritikus 20 mg/kg határt. A többi is tartalmaz glutént, de mennyiségük alapján a gluténmentes kategóriába sorolhatók.



4.diagram: Lisztek gluténszennyezettsége I.



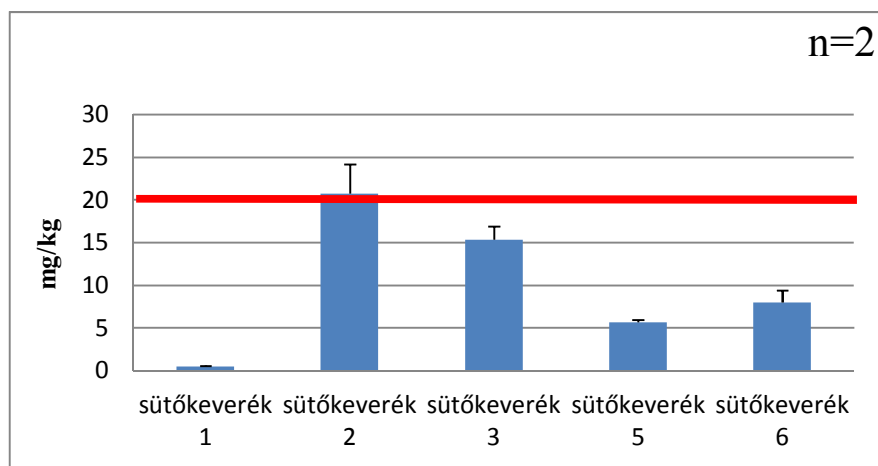
5.diagram: Lisztek gluténszennyezettsége II.



6. diagram: Lisztek gluténszennyezettsége III.

4.5 Különleges táplálkozási célra készült gluténmentes élelmiszerek gluténszennyezettsége

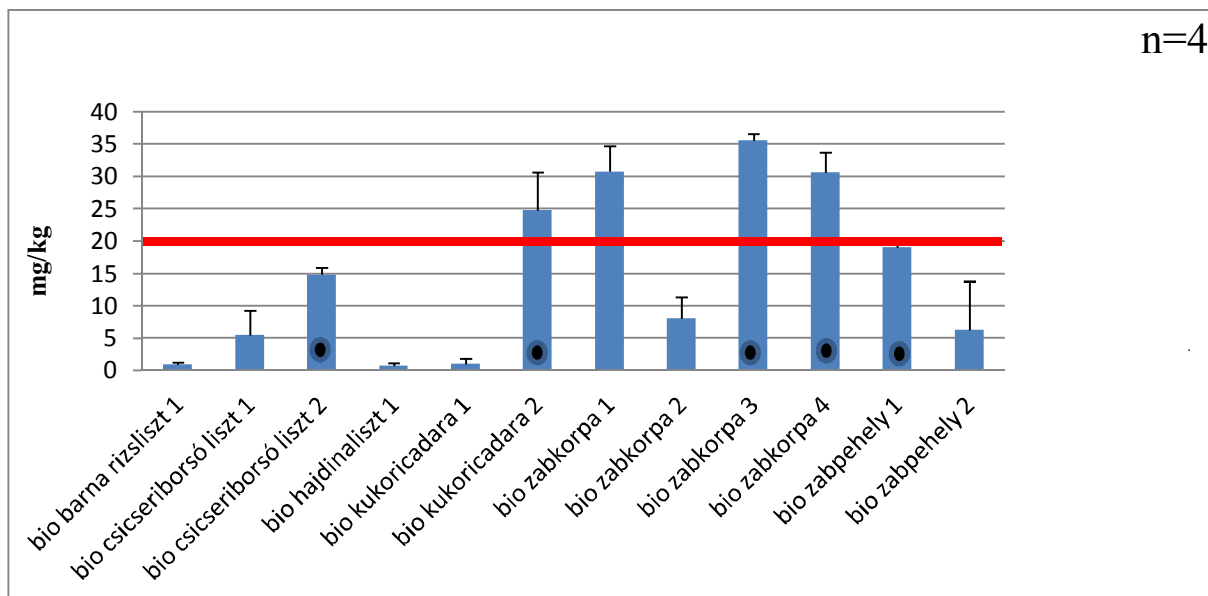
Ebbe a kategóriába olyan sütőkeverékek kerültek, melyek csomagolásán fel van tüntetve, hogy gluténmentesek. Részben természetesen gluténmentes növényekből készültek, részben pedig mesterségesen vonták ki belőlük a glutént. A 7. diagramon az látható, hogy a vizsgált hat mintából a „sütőkeverék 2” az, ami eléri, kicsit túlhaladja a jogszabály által meghatározott 20 mg/kg gluténmentességi határértéket. A többi minta gluténtartalma mind ez alatt van.



7. diagram: Különleges táplálkozási célra készült gluténmentes élelmiszerek gluténszennyezettsége

4.6 Biotermekek gluténszennyezettsége

A vásárolt termékek között több kifejezetten biotermesztésből származott. A 8. diagramon ezek gluténtartalmát hasonlítottam össze.



8. diagram: Biotermékek gluténszennyezettsége

A mért eredmények alapján a 4 minta (bio kukoricadara 2, bio zabkorpa 1,3,4) gluténszennyezettsége haladta meg a kritikus értéket, a többi nem. Ez alapján az állapítható meg, hogy a biogazdálkodás nem befolyásolja érdemben a termékek gluténszennyeztségét.

5. Diszkusszió

Saját eredményeim és a szakirodalom eredményeinek összehasonlítása

Vizsgálatom eredményei és a szakirodalomban olvasott eredmények nagy hasonlóságot mutatnak. Az Amerikai Dietetikus Szövetség tanulmányában (Thomson, Lee, Grace, 2010) a következő eredményeket kapta: a vizsgált 22 gluténmentes termékből 13 (59%) gluténmentes, 9 (41%) pedig átlépte a 20 mg/kg határértéket. Saját vizsgálatomban csoportos bontásban az alábbi arányok figyelhetők meg (V.táblázat):

minta csoport	gluténmentes	20 mg/kg határérték feletti
Zab termékek	16 db (70%)	8 db (30%)
Lisztek	24 (83%)	5 db (17%)
Különleges táplálkozási célra készült élelmiszerek	5 (84%)	1 db (16%)
Biotermékek	8 db (67%)	4 db (33%)

V.táblázat: Gluténmentesség és kritikus határérték feletti gluténszennyeződés aránya élelmiszerekben

Az adatok összevetése során találtam 3 élelmiszert, melyek az ADSZ és az én mintavételemben is szerepelnek (VI.táblázat). Gluténmentesség kérdésben ugyanaz mutatható ki mindkét oldalon.

Élelmiszer	ADS mérés	Saját mérés
kölesliszt 1	305 mg/kg	32 mg/kg
kölesliszt 2	327 mg/kg	36 mg/kg
barna rizsliszt	< 5 mg/kg	3 mg / kg
fehér rizsliszt	< 5 mg/kg	4,5 mg/kg

VI.táblázat: Élelmiszerek gluténszennyezettségének mértéke két különböző vizsgálatban

Mérési eredményeim azt mutatják, hogy a természetesen gluténmentes termékek tartalmaznak gluténszennyeződést. Az esetek többségében (60-70%) ez a szennyezettség

nem haladja meg a kritikus jogszabály által meghatározott határértéket, és így érvényes rájuk a gluténmentes elnevezés. Az ADS tanulmány eredményei is ezt támasztják alá.

A TEPNEL és R5 módszerek eredményeinél (1. diagram) megfigyelhetjük, hogy egyes mintáknál az értékkülönbség 1,5-2-szeres, bizonyos mintáknál viszont ez a különbség 6-7-szeres. A jelenség bemutatására 3 példát hozok (VII. táblázat):

minta	TEPNEL	R5	különbség
kölesliszt 1	1,8 mg/kg	73 mg/kg	40 x
kölesliszt 2	3,5 mg/kg	65,6 mg/kg	18 x
sárgaborsó liszt	4,4 mg/kg	60,6 mg/kg	14 x

VII.táblázat: R5 és TEPNEL módszer mérési eredményeinek összehasonlítása néhány élelmiszernél

Ilyen különbségek hatására felmerült bennem az alábbi kérdés: Nem lehetséges-e a módszereknél alul- vagy felülbecslés a valódi értékre vonatkozólag? Mivel a vizsgálatom célja nem ez volt, így erre választ nem tudok adni. Egy 2006-os cikkben (Kanerva et al., 2006)

azzal foglalkoztak, hogy mennyire pontos az R5 és TEPNEL módszer. Ezt úgy vizsgálták, hogy vettek egy ismert gluténtartalmú mintát és ezt megmérték mindkét módszerrel. Azt az eredményt kapták, hogy a TEPNEL alulbecsülte, az R5 felülbecsülte a valódi értéket. Ebből kiindulva feltételezhetem, hogy ezen szélsőségesen különböző eredmények a módszerek alul- és felülbecslésének köszönhetőek.

Az általam vizsgált minták között voltak olyanok, melyek a detektáláskor nem adtak értékelhető adatot. Ennek sok oka lehet: nem megfelelő előkészítés, túl alacsony/magas gluténtartalom, módszer végrehajtásbeli pontatlanság. Továbbá úgy gondolom, hogy a használt standardok, kontrollok minősége is befolyásolja a kapott eredményeket. Eckert is rávilágít cikkében (Eckert et al., 2006) arra, hogy a megfelelő standard minősége kulcskérdést jelent a mérési módszerek megbízhatósága szempontjából. Ugyanis a kalibrációs etalon hibája, rossz minősége befolyásolja az egész mérési folyamatot, és a rossz eredményeken keresztül téves következtetéseket fog eredményezni.

Hipotézisvizsgálat

A vizsgálat elején feltett hipotéziseim:

1. Feltételezem, hogy a természetesen gluténmentes termékek határérték alatti gluténmennyiséget tartalmaznak.
2. A természetesen gluténmentes és zab alapanyagú élelmiszerekről feltételezem, hogy a betakarítás, szállítás, raktározás és feldolgozás során szennyeződnek gluténnel.
3. A felhasznált két módszer (Tepnel és R5) mérési eredményei megegyeznek
4. A biotermékek nem szennyeződnek gluténnel a különleges termesztési módnak köszönhetően.

A mérési eredmények birtokában és azok analízisét követően alapvetően feltett hipotéziseimet a következőképpen értékelem:

Első hipotézisem, miszerint a természetesen gluténmentes termékek határérték alatti gluténmennyiséget tartalmaznak, hamis. A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy a minták nagy része kb. 70-80%-a határérték alatti gluténmennyiséget tartalmaz, azonban a fennmaradó 20-30%-ban a minták gluténtartalma meghaladja a kritikus 20 mg/kg határértéket. A gluténszennyezettség egyik esetben sem haladta meg a 100 mg/kg értéket.

Második hipotézisem, miszerint a természetesen gluténmentes és zab alapanyagú élelmiszerek a betakarítás, szállítás, raktározás és feldolgozás során szennyeződnek gluténnel, igaznak bizonyult. Természetesen gluténmentes és zab mintákat vizsgáltam, és az értékelhető mérési eredménnyel rendelkező minták mindegyikében kimutattam bizonyos mennyiségű glutént. A gluténszennyeződés mértéke mintánként eltérő.

Harmadik hipotézisem, miszerint felhasznált két módszer (Tepnel és R5) mérési eredményei megegyeznek, hamis. Adott mintákon elvégezve mindkét módszert, eltérő eredményeket kaptam. Az eredményeket T-próbával megvizsgáltam és arra jutottam, hogy a TEPNEL és R5 módszerek eredményei között (ugyanazon mintát vizsgálva) szignifikáns különbség van.

Negyedik hipotézisem, miszerint a biotermékek nem szennyeződnek gluténnel a különleges termesztési módnak köszönhetően, hamis. A vizsgált minták ugyanolyan arányban voltak gluténnel szennyeződve, mint a nem biotermékek.

6. Következtetések, javaslatok

A coeliakia felismerése a 21. században még nem olyan egyszerű és egyértelmű, mint ahogy a tudományos és technikai fejlettségből feltételezzük. Orvosok, betegek, egészségügyben járatos egyének együttműködését, pontos odafigyelését igényli. A lisztérzékenyek számára fogyasztható élelmiszerek vizsgálata, a glutén pontos, megbízható kimutatása 2012-ben még nem egy rutinfeladat. Számtalan tényező nehezíti a pontos, megbízható mennyiségi és minőségi mérést.

Módszertani következtetések, javaslatok

A megfelelő glutén kimutatási módszernek a szakirodalom alapján a következő elvárásoknak kell megfelelnie:

- magas specificitás és érzékenység
- csak nyomokban található allergének érzékelése
- mérési eredményük megbízható legyen
- mért eredmény pontos legyen
- kapott eredmény alapján eldönthessük, hogy a minta mely határértékfüggő kategóriába tartozik
- gyorsaság
- reprodukálhatók legyenek az eredmények
- költséghatékonyak legyenek
- fehérje alapú gluténdetektálási módszer esetében ne csak a prolaminok natív formáját, hanem a feldolgozás utáni formát is felismerjék

Az elmúlt évtizedekben kifejlesztett glutén kimutatására alkalmas módszerek közül alig van olyan, mely az összes elvárásnak megfelelne. A különféle módszerek egy vagy több elvárást nagyon jól kielégítenek, s inkább a specifikusságra törekszenek. A specifikusság azonban bizonyos tulajdonságok és mérhető mintatípusok elvesztését eredményezi. Másrészt viszont specifikusság egy adott minta részletesebb alaposabb megismerését, alkotóinak kimutatását teszi lehetővé. A tudományos kutatások, újabb biokémiai, allergénekkal kapcsolatos strukturális felismerések segítik az allergének (köztük a glutén) kimutatási módszerek fejlődését, ezáltal mérési eredményeik egyre pontosabbá, megbízhatóbbá válását.

Az általam alkalmazott TEPNEL és R5 szendvics ELISA módszerek mérési eredményeinek pontossága és megbízhatósága alapvetően függ a mérés elvégzésének módjától. A mérés elvégzésének módja alatt azt értem, hogy a mérést végző személy mennyire hajtja végre a leírásnak megfelelően a módszert. Vizsgálataim során kikristályosodott bennem, hogy melyek azok a műveleti lépések, melyek könnyen eltéveszthetők, ezáltal sikertelen mérést eredményeznek majd. A felsoroltak mindkét módszerre érvényesek.

- Minta előkészítésénél a centrifugacsövekbe pontosan a módszernek megfelelő mennyiségű mintát és extrakciós oldatot kell bemérni, ugyanis a centrifugálásnál az eltérő súlyú minták problémát okozhatnak.
- A mintákat és oldószereket megfelelő módon és előírt ideig kell homogenizálni, keverni, azért hogy a glutén ne maradjon a mátrixba zárva.
- A minták és reagensek pipettázásakor oda kell figyelni, hogy mekkora mennyiséget ír elő a módszer, és a pipettát mindig ennek megfelelő nagyságra kell állítani.
- A reagenseket pontosan az előírt várakozási idő letelte után kell a mintához adni, ugyanis a lépések között lejátszódó reakciók időfüggőek.
- A STOP reagens mintához adását követően 10 percn belül le kell olvasni az abszorbancia értékeket, mert az idő múlásával ezek változhatnak.

Szakirodalmak és saját tapasztalatom alapján javasolt lenne mind a TEPNEL, mind az R5 esetében az alkalmazott anyagok összetételén, minőségén változtatni. A következő anyagokat lenne érdemes megváltoztatni:

- standardok
- extrakciós oldat
- alkalmazott szubsztrát

Ezekkel kapcsolatos kutatások, fejlesztések jelenleg is zajlanak (Eckert et al., 2006 ; Broeck et al., 2009).

A vizsgálat eredményeivel kapcsolatos következtetések, javaslatok

A mért eredmények alapján kijelenthető, hogy olyan termékek, melyeknek természetesen nem szabadna glutént tartalmazni, eltérő mennyiségű gluténnal szennyeződtek. A szennyezés forrása konkrétan nem bizonyítható. A termékek életútja (miszerint a termék hogyan jut el a termőföldről a fogyasztóhoz) az uniós szabályozásnak köszönhetően feltérképezhető, ismert. Ezen információ és a mért értékek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a vásárolt természetesen gluténmentes termékek az aratás, szállítás, feldolgozás során szennyeződtek gluténnal. Ennek magyarázata az lehet, hogy a szállítóeszközök, feldolgozó gyártósorok nem csak természetesen gluténmentes növényeket, azok magjait szállítják, dolgozzák fel, hanem gluténtartalmú gabonaféléket egyaránt. Feltételezhetően a búza, árpa, rozs termékek szállítása és gyártása után történik tisztítás az adott eszközökön. Azonban teljesen eltüntetni a glutént nem lehet, és ami marad, az belekerül a természetesen gluténmentes termékekbe.

A két módszert összehasonlító 1. diagramon jól látható, hogy a minták többségénél a TEPNEL és az R5 módszer eredményei között nagy eltérések vannak adott mintára vonatkoztatva. 8 minta esetében a TEPNEL 20 mg/kg alatti értéket mutat. Ez azt jelenti, hogy a minta gluténmentes kategóriába tartozik. Az R5 viszont már a kritikus határ feletti értékeket mutat ugyanezen mintákra. A határérték feletti gluténtartalommal bíró termékek már a nagyon alacsony gluténtartalmú kategóriába tartoznak 20-100 mg/kg között. Tehát nem mindegy, hogy melyik módszert alkalmazzuk a gluténtartalom meghatározására, mert módszerenként más gluténtartalmi kategóriába sorolódnak be a minták. Ennek azért van jelentősége, mert a lisztérzékenyek egy csoportja nem képes tolerálni a nagyon alacsony gluténtartalmú élelmiszereket és csak gluténmentes termékeket ehet. Ezen csoport tagjai elvárják a forgalmazótól, hogy az általa árusított gluténmentes termék tényleg gluténmentes termék legyen. A forgalmazó ugyanezt várja a gyártótól. A gyártó pedig rákényszerül az EU és a fogyasztók részéről is, hogy minél gyakrabban ellenőriztesse a gluténszennyeződést gyártott termékeiben. A gyártó pedig elvárja a mérési módszerektől, hogy elég pontosan, nagy megbízhatósággal mutassák ki a glutént. Ezek alapján arra következtetek, hogy megvan a kellő motiváció és igény a módszerek folyamatos tökéletesítésére, fejlesztésére.

Az 7. diagramon feltüntetett különleges táplálkozási célú sütőkeverékek közül egy darab volt, ami elérte a kritikus határértéket, a többi ez alatt volt. Ebből arra következtettek, hogy azon cégek, melyek termékei gluténmentesek, és ezt még külön fel is tüntetik a csomagoláson, azok nagyon odafigyelnek, és megfelelően ellenőrzik, hogy milyen a gluténszennyezettség a termékeikben. Továbbá fontosnak tartják, hogy amire ráírják, hogy gluténmentes, az tényleg gluténmentes legyen.

A biotermékek szennyezettségét összehasonlító 8. diagram alapján kijelenthető, hogy a biogazdálkodás nem befolyásolja a gluténszennyeződés mértékét. Nem a termesztés módja okozza a gluténszennyezettséget. Ez alátámasztja, hogy a szennyeződés a szállítás és feldolgozás során kerül bele a termékekbe.

A zabtermékek sokáig tiltó listán voltak a lisztérzékenyek számára. Az elmúlt évtizedben bebizonyosodott, hogy a lisztérzékenyek egy csoportja még képes tolerálni a zabot, és ezáltal fogyaszthatja a zabból készült termékeket. Vizsgálatom azt bizonyítja, hogy a zabmintákban nem csak a zabra jellemző avenin prolamin található meg, hanem más gabonafélékből származó glutén is. A vizsgált minták kb. 30%-ában haladta meg a gluténtartalom a határértéket. Ebből az a következtetés vonható le, hogy a zabtermékek sem kivételek a gluténszennyezettség alól, de semmivel sem szennyezettebbek, mint a természetesen gluténmentes termékek.

A kapott eredmények jelzés értékűek, és arra hívják fel a figyelmet, hogy ez egy olyan dolog, amivel foglalkozni kell! A mérési eredményeknél azonban figyelembe kell venni, hogy vizsgált minta nem teljesen homogén alapsokaságból lett kiemelve. Tehát nem mindegy, hogy az adott zabkorpás csomagból honnan veszem a mintát. Ugyanis eltérő eredményt kaphatok, ha a csomag aljáról vagy a csomag tetejéből veszem ki a méréshez szükséges mennyiséget. Ennek fényében megbízható, reprezentatív eredményeket úgy kaphatunk, ha jóval nagyobb mintaszámmal, többször történik mérés, lehetőség szerint többféle módszerrel.

Magyarországon nem találtam olyan nyilvános, hozzáférhető listát, amely különböző gyártók természetesen gluténmentes termékeiről készült gluténszennyezettségi eredményeket tartalmazná. Érdekes lenne egy ilyen gluténszennyezettségi listát összeállítani független akkreditált laborok segítségével.

Ennek a következő előnyei lennének:

- Felhívna a figyelmet a fogyasztók részére, hogy a termékek gluténszennyezettsége egy létező valós probléma.
- Területi összehasonlításban például, ha kiderülne, hogy a külföldről behozott termékek jobban szennyezettek, mint a Magyarországon gyártott termékek, akkor a magyar termékek előnybe kerülhetnének a külföldiekkel szemben.
- Motiválná a gyártókat a gyártásközi gluténszennyezettség rendszeres vizsgálatára. Ugyanis ha a szennyezettség mértékét állandóan minimális, határérték alatt tudják tartani, akkor jobban elnyerhetik a fogyasztók bizalmát.
- A meglévő mérési módszereket folyamatosan tökéletesítenék, valamint kutatócsoportok új módszereket fejlesztenének ki a megbízhatóbb, pontosabb mérési eredmények érdekében. Ezen felül pedig megnőne az igény gyorsabb, kevésbé idő és munkaigényes gyorsmódszerekre a gyártók és fogyasztók köreiben.
- A magas gluténszennyezettségű termékekből egy „fekete” lista készülne. Ezáltal a lisztérzékenyek biztosan nem vennék meg ezen termékeket és így a betegség kellemetlen tüneteinek ételmiszer okozta kiújulása megelőzhető lenne.

Összefoglalás

A coeliakia egy autoimmun betegség, melyet a búzában, árpában, rozsban, zabban található prolaminek váltanak ki az arra érzékeny egyéneknél. A betegség kezelésére az egyetlen megoldást az egész életen át tartó gluténmentes diéta jelenti, amellyel teljes tünetmentesség érhető el. A lisztérzékenyek számára 2012-re már széles áruválaszték áll rendelkezésre a gluténmentes diétához. A jogi szabályozás és a fogyasztók elvárásainak teljesítése szükségesszerűvé teszi a termékek megvizsgálását abban a tekintetben, hogy tartalmaznak-e 20 mg/kg határérték feletti gluténszennyezettséget.

Vizsgálatom során kereskedelmi forgalomban kapható gluténmentes élelmiszerek három nagy csoportját vizsgáltam meg: természetesen gluténmentes termékek, zab termékek, különleges táplálkozási céllal készített gluténmentes termékek. Egyik fő célkitűzésem az volt, hogy a felsorolt csoportokból vett mintákat megvizsgáljam gluténszennyezettség szempontjából. A glutén kimutatásához a jelenleg leggyakrabban alkalmazott két szendvics ELISA módszert választottam: G α -gliadin kimutatására alkalmas TEPNEL-t és az R5 módszert. Vizsgálatom másik fő célkitűzéseként a két módszer összehasonlítását választottam.

A mérés eredményei azt tükrözik, hogy az összes vizsgált minták különböző mértékben szennyeződtek gluténnal. A zab termékek 33%-a, a lisztek 17 %-a, a különleges táplálkozási célra készült élelmiszerek 16 %-a és a biotermékek 33 %-a tartalmazott jogszabályi határértéken (20 mg/kg) felüli gluténszennyeződést. Ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy a termékek az aratás, szállítás, feldolgozás, csomagolás során eltérő mértékben, de szennyeződnek gluténnal.

A két mérési módszer eredményei között szignifikáns különbség van. Ez a különbség nem csak számértékbeli eltérést jelent, hanem gluténtartalmi kategóriaváltozást is.

A vizsgálat eredményei biztató motivációt adnak további mérések elvégzésére, a témában történő részletesebb elmélyülésre.

Irodalomjegyzék

- 89/2003/EC (XI.10.)** Direktíva a kész termékekben található allergének feltüntetési kötelezettségeiről. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:308:0015:0018:EN:PDF>
- 36/2004. (IV. 26.)** ESzCsM rendelet a különleges táplálkozási célú élelmiszerekről http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A0400036.ESC
- 41/2009/EK (I.20)** Bizottsági rendelet a lisztérzékenységben szenvedőknek szánt élelmiszerek összetételéről és címkézéséről. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:016:0003:0005:HU:PDF>
- Allergének címkézése élelmiszereinken** (2005). Hozzáférhető 2012-03-18, <http://www.eufic.org/article/hu/artid/allergenek-cimkezes-elelmiszereinken/>
- Amend, T. Belitz, H. D. (1990):** GLUTEN FORMATION STUDIED BY THE TRANSMISSION ELECTRON-MICROSCOPE, *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 191-3-184-193
- Arangoa, M.A., Campanero, M.A., (2000).** Evaluation Characterisation of gliadin nanoparticles and isolates by reversed – phase HPLC *Journal of Cereal Science*, 31, 223-228
- Baking Industry Research Trust.**(2012). Hozzáférhető 2012-03-18, <http://www.bakeinfo.co.nz/files/large/55/gluten.jpg?width=358&height=198>

Broeck, H.C., America, H.P., Smulders, J.M., Bosch, D., Hamer, J., Gilisen, J.W.J, Meer, M., (2009). A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat.

Journal of Chromatography B, 877, 975-982

DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction. (2012). Hozzáférhető 2012-03-18, <http://www.ucl.ac.uk/~ucbhjow/b200/pcr.htm>

Eckert, B., Amend, T., Belitz, H. D., (1993). THE COURSE OF THE SDS AND ZELENY SEDIMENTATION TESTS FOR GLUTEN QUALITY AND RELATED PHENOMENA STUDIED USING THE LIGHT-MICROSCOPE

Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung, 196, 2, 122-125

Eckert, R., Sharf, M., Wald, T., Pfannhauser, W., (1997): Determination of proteins with ELISA methods: doubtful quantitative results? In Amado, R., Battaglia, R. (szerk). Authenticity and Adulteration of food, the Analytical Approach: Proceedings of the Ninth European Conference on Food Chemistry, FECS Event No. 220, vol 1. Swiss Society of Food and Environmental Chemistry(SGLUC), Zürich, pp. 263-268

Eckert, R., Berghofer, E., Ciclitiria, P.J., Chirido, F., Denery-Papini, S., Ellis, H.J., Ferranti P., Goodwin, P., Immer, U., Mamone, G., Méndez, E., Mothes, T., Novalin S., Osman, A., Rumbo, M., Stern, M., Thorell, L., Whim, A., Wieser, H. (2006). Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation.

Journal of Cereals Science, 43, 331-341

Epitomics – Better Antibodies, Better Science. (2012). Hozzáférhető 2012-03-18, http://www.epitomics.com/images/products/sandwich_dual.jpg

- Gasztonyi, K.**, (1987). Nagy hatékonyságú (nagynyomású) folyadékkromatográfia (HPLC). In R. Lásztity, & D. Törley. *Az élelmiszer analitika elméleti alapjai I. kötet.* (pp. 218-229). Budapest: Mezőgazdasági Kiadó
- Glutén-érzékenyeknek szánt élelmiszerek.** (2012). Hozzáférhető 2012-03-18, <http://www.oeti.hu/?m1id=3&m2id=143>
- Horacsek M.** (1995) A gliadin kimutatása élelmiszerekben. Doktori értekezés tézisei, Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem
- JOHN PRESUTTI R., DO, JOHN R. CANGEMI, MD, HARVEY D. CASSIDY, MD,** and DAVID A. HILL, DO (2007). Celiac disease. *American Family Physician*, 15;76(12):1795-1802.
- Juhász, M (2008)** A coeliakia szocio-epidemiológiai vonatkozásai. In Juhász, M. (szerk), (2008). *Coelikia – a közös kihívás.* (pp 11-22) Semmelweis Kiadó: 2008. ISBN: 9789639656994
- Juhász, M (2009).** Coeliakia. In Temesvári, E., & Kárpáti, S. (szerk), (2009). *Gyakorlati allergológia.* (pp. 295-305). Budapest: Semmelweis Kiadó, ISBN: 978 963 9879 31 7
- Kanerva, M.P., Sontag-Strohm, S.T., Röppy, H.P., Alho-Lehto, P., Salovaara, O.H.,** (2006). Analysis of barley contamination in oats using R5 and GQ-gliadin antibodies *Journal of Cereal Science*, 44, 347-352

Korponay-Szabó, I. (2008). A coeliakia aktív felismerési stratégiája és a diagnózishoz minimálisan teljesítendő követelmények. In Juhász, M. (szerk), (2008)

Coelikia – a közös kihívás (pp. 33-47).

Semmelweis Kiadó, ISBN: 9789639656994

Különleges Táplálkozási Célú Élelmiszerek. (2012). Hozzáférhető 2012-03-18,

<http://www.oeti.hu/?m1id=3&m2id=127>

Ludvig, M., S. (2002). Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder.

Nature Reviews Immunology 2, 647-655,

doi:10.1038/nri885

Lundh, G., & Macritchie, † F. (1989). Size exclusion HPLC characterisation of gluten protein fractions varying in breadmaking potential.

Journal of Cereal Science, 10(3) 247–253

Magyar, A. (2008). Coeliakia a háziorvosi praxisban. In Juhász, M. (szerk), (2008)

Coelikia – a közös kihívás (pp. 67-75).

Semmelweis Kiadó, ISBN: 9789639656994

Mena, M., C., Lombardía, M., Hernando, A., Méndez, e., Albar, J., P., (2012).

Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and competitive ELISA based on R5 antibody. *Talanta*, In Press. Available online xxx

Mentőöv kezdő gluténérzékenyeknek. (2012). Hozzáférhető 2012-03-18,

<http://www.liszterzekeny.hu/tiki->

[index.php?page=Startcsomag&bl=n&saved_msg=y](http://www.liszterzekeny.hu/tiki-index.php?page=Startcsomag&bl=n&saved_msg=y)

- Mujico**, J.R., Lombardía, M., Mena, M.C., Méndez, E., Albar, J.P., (2011). A highly sensitive real-time PCR system for qualification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. *Food Chemistry*, 128, 795-801
- Némedi**, E., Ujhelyi, G., Gelencsér, É., (2007). Detection of gluten contamination with PCR method . *Acta Alimentaria*, 36 (2), 241-248
- Osborne**, T.B. (1907) The proteins of the wheat kernel. Carnegie Institution Washington Publ 84:1-119 29
- Shewry**, P. R., Tatham, A. S., Forde, J., Kreis, M., Miflin, B.J. (1986). The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *Journal of Cereal Science* 4, 97-106
- Sutton**, K.H., Hay, R.L., Griffin, W.B. (1989). Assessment of the potential bread baking quality of New Zealand wheats by RP-HPLC of glutenins. *Journal of Cereal Science*. 10 (2), 113–121
- Takács**, K (2008) Főbb gabona allergének immunanalitikai kimutatása. Doktori (Phd) értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Doktori Iskola
- Tímár**, E., & Matuz, J. (1996) A glutén és a coeliakia legújabb ismereteink tükrében. *Gyermekgyógyászat*, 47(2) 136-144
- Thomson**, T., Lee, A.R., Grace, T., (2010). Gluten contamination of grains, seeds, and flours in the United States: A pilot study *Journal of the American Dietetic Association* 110, 937-940

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Varga Zsuzsa tanárnőnek, témavezetőmnek, hogy maximálisan segített, szakmailag támogatott szakdolgozatom elkészítésében.

Szeretném megköszönni Sütő Ágnesnek, Kerekes Katának, hogy segítettek a minták előkészítésében.

Köszönöm barátnőmnek és lakótársaimnak, hogy mellettem álltak és türelmükkel, szeretetükkel segítették munkámat.

Záradék

Alulírott Nagy Gábor Zsolt nyilatkozom, hogy a dolgozat saját szellemi termékem, azt más szakon szak/diploma dolgozatként sem én sem mások nem nyújtották be, és csak a megjelölt segédeszközöket használtam.

Aláírás:.....

Mellékletek

1.sz melléklet: A két módszer összehasonlításánál vizsgált élelmiszerek

<i>Gyártó</i>	<i>Termék</i>	<i>Diagram jelölés</i>
Alnatura	Haferkleine bio zabkorpa csírával	bio zabkorpa 1
Alnatura	Haferkleine flocken bio zabpehely nagy szemű	bio zabpehely NSZ
Balogh	sárgaborsó liszt	sárgaborsó liszt
Biorganik	bio csicseriborsó liszt	bio csicseriborsó liszt
Glück	bio zabkorpa	bio zabkorpa 2
kenyér varázs	kukoricaliszt	kukoricaliszt
Natura	zabpehely liszt	zabpehely liszt 1
Natura	zabpehely liszt	zabpehely liszt 2
Natura	zabpehely liszt	zabpehely liszt 3
Natura	hajdina liszt	hajdina liszt 1 és 2
Natura	kölesliszt	kölesliszt 1 és 2

2.sz melléklet: A két módszer összehasonlításánál mért és számolt adatok

<i>Diagram jelölés</i>	TEPNEL (mg/kg)				ÁTLAG	SZÓRÁS	R5 (mg/kg)				ÁTLAG	SZÓRÁS	F-PRÓBA	T-PRÓBA
bio zabpehely NSZ	7,7069	4,2498	7,7069	4,2498	5,9784	1,9960	40,1720	35,9114	40,1720	35,9114	38,0417	2,4598	0,739615113	7,17241E-07
sárgaborsó liszt	2,1392		6,8214	4,1528	4,3711	2,3488	58,7944	56,8121	60,6175	66,2880	60,6280	4,0808	0,517350418	2,0497E-06
bio csicseriborsó liszt	8,1072	7,2703	1,0353		5,4709	3,8641	27,6249	28,0436	32,0697	31,0701	29,7021	2,2017	0,374831697	0,001190409
zabpehely liszt 1	27,6770	14,3295	27,6770	14,3295	21,0032	7,7062	36,4419	37,5028	28,6523	31,9747	33,6429	4,0997	0,327488373	0,018868752
zabpehely liszt 2	7,5547	6,9923	7,5547	6,9923	7,2735	0,3247	36,4419	37,5028	28,6523	31,9747	33,6429	4,0997	0,001667712	0,000480748
zabpehely liszt 3	7,4522	2,9762	7,4522	2,9762	5,2142	2,5843	36,4419	37,5028	28,6523	31,9747	33,6429	4,0997	0,468404032	3,66787E-05
hajdina liszt 1	16,1496	18,3209	14,0389	16,4043	16,2284	1,7521		6,6292	3,7479	1,2575	3,8782	2,6882	0,485607708	0,002349231
kölesliszt 1	0,9469	0,6042	2,8800	2,7482	1,7948	1,1865		72,3187	71,5090	75,3005	73,0427	1,9968	0,407476581	5,57091E-06

<i>Diagram jelölés</i>	TEPNEL (mg/kg)				ÁTLAG	SZÓRÁS	R5 (mg/kg)				ÁTLAG	SZÓRÁS	F-PRÓBA	T-PRÓBA
bio zabkorpa 1	29,3756	29,7600	27,5082	36,4943	30,7846	3,9315	69,7436	73,4342	72,3367	69,1808	71,1738	2,0395	0,309577282	1,07208E-05
bio zabkorpa 2	8,5517	12,5060	4,6775	6,4646	8,0500	3,3663	65,0399	67,7616	54,0929	58,1613	61,2639	6,2591	0,33545772	2,21558E-05
kukoricaliszt	1,9145	2,9158	1,7793	3,0594	2,4173	0,6635	4,4752	14,3368	5,9989	13,2674	9,5196	5,0031	0,007674078	0,015286952
hajdina liszt 2	26,8787	28,5349	27,6815	30,2755	28,3426	1,4552		32,0902	32,5806	16,7731	27,1480	8,9882	0,014716278	0,399008774
kölesliszt 2	2,5778	4,5635	2,7637	4,3945	3,5749	1,0490	63,3474	65,3093	67,0219	66,8330	65,6279	1,7027	0,447302542	1,05705E-08

3.sz melléklet: Az élelmiszerek glutén szennyezettségvel kapcsolatos mért és számolt adatok 1

Gyártó	Termék	Diagram jelölés	A1	A2	B1	B2	ÁTLAG	SZÓRÁS
Vegabond	barna rizsliszt	barna rizsliszt 1	1,1578	1,8783	5,8237	5,6391	3,6247	2,45147
Vegabond	Barna rizsliszt	barna rizsliszt 2	12,6318	10,5454	14,1238	6,9913	11,0731	3,091735
Vegabond	Barna rizsliszt	barna rizsliszt 3	0,1781	0,3767	0,3514	0,5119	0,3545	0,137088
Glück	bio barna rizsliszt	bio barna rizsliszt 1	0,7569	1,2343			0,9956	0,337573
Biorganik	bio csicseriborsó liszt	bio csicseriborsó liszt 1	8,1072	7,2703	1,0353		5,4709	3,864091
Biorganik	bio csicseriborsó liszt	bio csicseriborsó liszt 2	13,8124	14,0218	16,0348	15,5351	14,8510	1,100845
Glück	bio hajdinaliszt	bio hajdinaliszt 1	0,2964	0,5922	0,8414	1,3442	0,7686	0,443721
Bio pont	bio kukoricadara	bio kukoricadara 1	0,4232	0,9175	0,7569	2,2103	1,0770	0,783081
bio pont	bio kukoricadara	bio kukoricadara 2	29,6401	30,0952	19,6672	19,8207	24,8058	5,848195
Alnatura	Bio zabkorpa csírával	bio zabkorpa 1	29,3756	29,7600	27,5082	36,4943	30,7846	3,931528
Glück	Bio zabkorpa	bio zabkorpa 2	8,5517	12,5060	4,6775	6,4646	8,0500	3,366255
Alnatura	Bio zabkorpa csírával	bio zabkorpa 3	34,8718	36,7171	36,1683	34,5904	35,5869	1,019768
Glück	Bio zabkorpa	bio zabkorpa 4	32,5200	33,8808	27,0464	29,0807	30,6320	3,129547
Alnatura	Haferkleine flocken bio zabpehely nagy szemű	bio zabpehely 1	20,0860	17,9557	20,0860	17,9557	19,0208	1,229913
Alnatura	bio zabpehely apró	bio zabpehely 2	11,6019	0,9386			6,2703	7,540122
BIO	csicseriborsó liszt	csicseriborsó liszt 1	23,3537	23,5646	21,4645	23,1956	22,8946	0,965302
Natura	csicseriborsó liszt	csicseriborsó liszt 2	1,0084	1,5092	1,1314	0,9732	1,1556	0,245342
Natura	csicseriborsó liszt	csicseriborsó liszt 3	1,9610	1,6230	1,7582	3,6002	2,2356	0,920278
Natura	hajdinaliszt	hajdinaliszt 1	16,1496	18,3209	14,0389	16,4043	16,2284	1,752095
Natura	hajdinaliszt	hajdinaliszt 2	26,8787	28,5349	27,6815	30,2755	28,3426	1,455212
Natura	hajdinaliszt	hajdinaliszt 3	16,0125	3,3146	1,8740	0,6288	5,4575	7,121758
Natura	hajdinaliszt	hajdinaliszt 4	16,0451	16,2903	16,0451	16,2903	16,1677	0,141586
Natura	hajdinaliszt	hajdinaliszt 5	4,9392	8,3865	4,9392	8,3865	6,6629	1,990326

4.sz melléklet: Az élelmiszerek glutén szennyezettségvel kapcsolatos mért és számolt adatok 2

Gyártó	Termék	Diagram jelölés	A1	A2	B1	B2	ÁTLAG	SZÓRÁS
Natura	kölesliszt	kölesliszt 1	0,9469	0,6042	0,9469	0,6042	0,7755	0,197854
Natura	kölesliszt	kölesliszt 2	2,8800	2,7482	2,8800	2,7482	2,8141	0,076098
Biomag malom	kölesliszt	kölesliszt 3	15,0943	15,6886	21,0623		17,2817	3,287548
Natura	kölesliszt	kölesliszt 4	2,5778	4,5635	2,7637	4,3945	3,5749	1,048994
BIO	kölesliszt	kölesliszt 5	7,3138	7,4912			7,4025	0,12547
Natura	kölesliszt	kölesliszt 6	36,1593	35,7545	37,6502		36,5214	0,998379
Natura	kölesliszt	kölesliszt 7	31,6737	32,6546	33,5110	33,4165	32,8139	0,851348
kenyér varázs	kukoricaliszt	kukoricaliszt 1	1,9145	2,9158	1,7793	3,0594	2,4173	0,663483
Nett Food	kukoricaliszt	kukoricaliszt 2	0,6555	0,7443			0,6999	0,062735
kenyér varázs	kukoricaliszt	kukoricaliszt 3	7,1684	7,1684	6,6337	6,6337	6,9011	0,308704
kenyér varázs	kukoricaliszt	kukoricaliszt 4	2,2376	2,9994	2,2376	2,9994	2,6185	0,439845
Kenyérvarázs	rizsliszt	rizsliszt 1	8,4711	1,0232	3,5705	4,9534	4,5046	3,105246
Balogh	sárgaborsó liszt	sárgaborsó liszt 1	2,1392		6,8214	4,1528	4,3711	2,34876
Balogh	sárgaborsó liszt	sárgaborsó liszt 2	29,3972	28,4060	30,3074	33,1440	30,3137	2,040413
Schar	Mix Pan kenyérliszt	sütőkeverék 1	0,4358	0,5203			0,4781	0,059747
Glutenix	falusi kenyér sütőkeverék	sütőkeverék 2	23,1314	18,3743			20,7528	3,363779
Glutenix	foslós kalács sütőkeverék	sütőkeverék 3	14,2931	16,4182			15,3557	1,502647
GlutenEX	barna kenyér liszt	sütőkeverék 5	5,5267	5,8351			5,6809	0,218078
GlutenEX	szuper mix kenyér sütéshez	sütőkeverék 6	7,0476	8,9657			8,0067	1,356266
BIO	zabital	zabital	23,5822	13,7495	24,9178	25,9811	22,0577	5,625026

5.sz melléklet: Az élelmiszerek glutén szennyezettségvel kapcsolatos mért és számolt adatok 3

Gyártó	Termék	Diagram jelölés	A1	A2	B1	B2	ÁTLAG	SZÓRÁS
Glük Bio	zabkorpa	zabkorpa 1	12,2382	10,9641	11,7461	8,0116	10,7400	1,893059
Natura	zabkorpa	zabkorpa 2	0,6936	1,0569	1,6864	0,7274	1,0410	0,460383
Alnatura	Hafer flocken	zabpehely 1	15,8936	20,0235	19,7071		18,5414	2,298527
Alnatura	Haferkleine flocken bio zabpehely nagy szemű	zabpehely 10	7,7069	4,2498	7,7069	4,2498	5,9784	1,995968
Alnatura	Hafer Kleie	zabpehely 2	13,3893	16,1045	12,7302	23,1868	16,3527	4,784366
Davert	Hafer Kleie	zabpehely 3	6,5530	7,3702	3,4687	3,7587	5,2877	1,965032
Kölln	Nagyűszemű zabpehely	zabpehely 4	13,3278	12,8269	13,3278	12,8269	13,0773	0,289171
Kölln	Kisszemű zabpehely	zabpehely 5	23,4504	26,1656	23,4504	26,1656	24,8080	1,567614
Kölln	Kisszemű zabpehely	zabpehely 6	2,2825	0,3494	2,2825	0,3494	1,3159	1,1161
Kölln	Nagyűszemű zabpehely	zabpehely 7	1,7465	1,8695	1,7465	1,8695	1,8080	0,071025
Kölln	zabpehely nagy szemű	zabpehely 8	6,0936	6,0936	11,8919	11,8919	8,9927	3,347623
Kölln	flocken teljes kiőrlésű zabpehely	zabpehely 9	39,1849		38,0325	30,7908	36,0027	4,550316
Glük Bio	zabpehelyliszt	zabpehelyliszt 1	38,0281	41,6835	41,3759	44,6974	41,4462	2,727345
Natura	zabpehelyliszt	zabpehelyliszt 2	27,6770	14,3295	27,6770	14,3295	21,0032	7,706166
Natura	zabpehelyliszt	zabpehelyliszt 3	7,5547	6,9923	7,5547	6,9923	7,2735	0,324684
Natura	zabpehelyliszt	zabpehelyliszt 4	2,9762	7,4522	2,9762	7,4522	5,2142	2,584253
Natura	zabpehelyliszt	zabpehelyliszt 5	18,2209	18,7514	14,3261	15,9874	16,8215	2,049844