

مروری بر آلرژی‌های غذایی و روش‌های نوین شناسایی آن‌ها در مواد غذایی

صفیه رجب‌زاده شان‌دیز^{۱*}، محبوبه سرابی جماب^۲

۱- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد، ایران

۲- هیات علمی بخش زیست فناوری صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد، ایران

Safieh.rajabzadeh@gmail.com

چکیده

آلرژی غذایی، نتیجه واکنش بیش از اندازه دستگاه ایمنی به برخی غذاها یا موادی است که معمولاً بی‌خطرند و اصولاً درگیری سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی IgE در آن کاملاً مشهود است. واکنش‌های آلرژیک نسبت به این غذاها معمولاً ناشی از پروتئین‌هایی هستند که موجب واکنش‌های ایمنولوژیک اختصاصی می‌شوند. تعدادی از سندرم‌های بالینی خاص که در اثر آلرژی غذایی ایجاد می‌شوند، عبارت است از شوک آنافیلاکسی، آسم و درماتیت آتوپیک. آلرژن‌های غذایی از طریق ترکیباتی در غذا که سبب تحریک و ایجاد واکنش‌های ایمنولوژیکی آلرژی می‌شوند، قابل ردیابی هستند و شناسایی آن‌ها کار بسیار سختی است. از طرفی آزمون‌های طراحی‌شده به‌منظور شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات آلرژن در محصولات غذایی طبق تعریف DBPCFC باید بتواند محدوده‌ای بین کمتر از یک میلی‌گرم تا بیشتر از یک گرم آلرژن در یک کیلوگرم ماده غذایی را شناسایی کند. در حال حاضر عمده روش‌های موجود، مبتنی بر شناسایی قطعات DNA یا ترکیبات پروتئینی ترکیبات آلرژن است که هرکدام دارای مزایا، معایب و کاربردهای مختلف می‌باشد. روش‌های مبتنی بر پروتئین، معمولاً شامل تشخیص‌های ایمنونوشیمیایی بوده و معروف‌ترین آن‌ها روش الایزا است. درحالی‌که در روش‌های مبتنی بر DNA، از تکثیر یک قطعه خاص از DNA به کمک دو پرایمر و یک پلیمرز مقاوم به حرارت استفاده می‌شود.

کلمات کلیدی: آلرژی غذایی، آلرژن، آنتی‌بادی IgE، روش مبتنی بر DNA، روش مبتنی بر پروتئین

مقدمه

ارثی یا ناشی از یک نقص اکتسابی بیوشیمیایی باشد.

علائم ممکن است در عرض چند دقیقه یا چند ساعت پس از خوردن آن غذای به‌خصوص ظاهر شوند. نباید آلرژی را با واکنش‌های عدم تحمل مواد غذایی، واکنش‌های فارماکولوژی و واکنش‌های نیمه سمی که

آلرژی هنگامی رخ می‌دهد که فرد نسبت به ترکیبات غذایی خاص مانند برخی پروتئین‌ها حساسیت پیدا کرده و واکنش سیستم ایمنی به‌طور خفیف یا شدید بروز می‌کند. این واکنش‌های نامطلوب ممکن است

سیستم ایمنی در آن درگیر نمی‌شود، اشتباه کرد. برای مثال افرادی که نسبت به لاکتوز موجود در شیر عدم تحمل دارند، به شیر حساسیت ندارند. زیرا واکنش‌هایی که در بدن آن‌ها ایجاد می‌شود، ناشی از کمبود آنزیم لاکتازی است که برای هضم قند شیر لازم است و هیچ‌گونه درگیری سیستم ایمنی وجود ندارد. به عبارت دیگر هیچ نوع ایمونوگلوبولینی در بدن افزایش نمی‌یابد. حساسیت غذایی به‌طور عمده در کودکان و شیرخواران بروز می‌کند و بیشتر این حساسیت‌ها تا سن پنج‌سالگی از بین می‌رود. البته هر چه سن شروع حساسیت پایین‌تر باشد، احتمال اینکه مدت ماندگاری و شدت آن بیشتر شود، افزایش می‌یابد. در دهه‌های اخیر آلرژی به‌عنوان یک مشکل تهدیدکننده سلامت عمومی مطرح گردیده است (۱).

۲- تاریخچه آلرژی غذایی

مشاهده و گزارش عوارض ناشی از مصرف مواد خوراکی به هزاران سال پیش برمی‌گردد. البته واژه آلرژی مربوط به قرن اخیر است. حدود ۴۰۰ سال قبل از میلاد مسیح Hippocrates برای اولین بار عوارض مضر ناشی از مصرف شیر گاو را که مشکلات پوستی و گوارشی بود، مطرح نمود (۲). Galen (۱۳۱ تا ۲۱۰ میلادی) واکنش‌های شبه آلرژیک را در یک کودک بعد از استفاده از شیر بز گزارش نمود. Pierre Borel (۱۶۵۶) برای اولین بار آزمون پوستی با سفیده تخم‌مرغ را در کشور فرانسه انجام داد. در سال ۱۹۰۲، Richet برای اولین بار شوک آنافیلاکسی ناشی از غذا را تشریح نمود. سه سال بعد در سال ۱۹۰۵، Finkelstein _ Schlosman گزارش مواردی از شوک آنافیلاکسی مرگ‌بار پس از مصرف شیر گاو را مطرح کردند. این دو دانشمند برای اولین بار ایمونوتراپی از

راه دهان را جهت درمان بیماری آلرژی مطرح کردند. سرانجام در سال ۱۹۶۷ به‌صورت هم‌زمان در آمریکا، توسط زوج ژاپنی به نام Ishizaka و در سوئد، توسط Johansson مولکول IgE کشف گردید. با مشخص شدن نقش IgE در واکنش آلرژیک، مطالعاتی جهت شناخت مولکول‌های موجود در مواد آلرژی‌زا که باعث ایجاد آلرژی می‌شوند، انجام شد و تاکنون صدها آلرژی‌زا شناسایی شده‌اند (۳).

۳- شیوع انواع بیماری‌های آلرژی غذایی

میزان شیوع آلرژی غذایی در بین افراد یک جامعه، ارتباط مستقیمی با سن افراد دارد بطوری‌که بیشترین شیوع آن در کودکان است (۱۰٪) و میزان فراوانی آن در بالغین کاهش می‌یابد (۱ تا ۲ درصد). به نظر می‌رسد که ۳۰ تا ۴۰ درصد از درماتیت‌های آتوپیک کودکان در ارتباط با آلرژی غذایی باشد، این در حالی است که در بالغین فقط ۲۰٪ از درماتیت‌های آتوپیک وابسته به آلرژی غذایی است. هرچند بیش از ۱۷۰ نوع غذا موجب واکنش‌های ایمنی به‌واسطه IgE شده‌اند، رایج‌ترین مطالعات انجام شده تنها بر روی غذاهایی بوده‌اند که به‌طور شایع موجب آلرژی می‌شوند. در ایالات متحده، این غذاها شامل تخم‌مرغ، شیر گاو، بادام‌زمینی، سویا، گندم و ماهی است و بر اساس تحقیق انجام‌شده در سال ۱۳۹۱ در مرکز طبی کودکان (تهران)، در بیماران ایرانی، گندم، شایع‌ترین آلرژی غذایی بود و در درجه بعد، شیر، تخم‌مرغ، سویا و آجیل، از دیگر عوامل شایع آلرژی غذایی در ایران می‌باشند (۴).

۴- پاتوفیزیولوژی

سطوح مخاطی دستگاه گوارش (GALT) Gastrointestinal Associated Lymphoid Tissues

محل اصلي شکل‌گيري واكنش‌هاي آلرژيك مي‌باشند. اين سطوح از يك سو سد فيزيكي را در مقابل محيط بيروني بدن تشكيل مي‌دهند و از سويي ديگر امكان پردازش و هضم مواد غذايي، جذب مواد غذايي تجزيه‌شده و دفع ضايعات را فراهم مي‌سازد. سيستم ايمني وابسته به اين سطوح مخاطي، توانايي تفكيك ميان مواد غذايي بي‌خطر، ميكروب‌هاي همزيست بي‌خطر و عوامل بيماري‌زاي خطرناك را دارد. همانند ساير قسمت‌هاي بدن، در اين قسمت نيز سيستم ايمني شامل ايمني ذاتي و ايمني اكتسابي است، اما سيستم ايمني اكتسابي سطوح مخاطي با نقش مهاري خود در پاسخ به آنتي‌ژن‌هاي غيرخطرناك (مواد غذايي) و همچنين ايجاد يك پاسخ سريع در مقابل عوامل بيماري‌زا، نقش مهم و مفيدي را در حفاظت از اين سطوح ايفا مي‌كند. به نظر مي‌رسد كه در كودكان، تكامل ناقص اجزاي مختلف سطوح مخاطي باعث كاهش كارايي اين سد فيزيكي است. اين مسئله مي‌تواند نقش مهمي در شيوع بيماري‌هاي آلرژي غذايي و عفونت‌هاي دستگاه گوارش در سال‌هاي اوليه زندگي ايفا نمايد (۵-۸). باوجود تكامل سد فيزيكي متشكل از سطوح مخاطي دستگاه گوارش در افراد بالغ، حدود ۲٪ از آنتي‌ژن‌هاي غذاهاي استفاده شده به‌صورت كامل و دست‌نخورده (فعال از نظر ايمونولوژيك) پس از جذب به قسمت‌هاي مختلف بدن راه پيدا مي‌كنند. اغلب اوقات وقتي اين آنتي‌ژن‌ها از سطوح مخاطي عبور مي‌كنند، توانايي تحريك سيستم ايمني را نداشته و باعث ايجاد فرآيند تحمل مي‌شوند. به‌طور معمول آنتي‌ژن‌هاي محلول مانند آنتي‌ژن‌هاي غذايي از توانايي ايمني‌زايي ضعيفي برخوردار مي‌باشند و اغلب باعث ايجاد تحمل

مي‌شوند. اين عدم پاسخ‌گويي، تحمل ايمونولوژيك Immunological Tolerance ناميده مي‌شود و هرگاه اين پديده در سطوح مخاطي دستگاه گوارش پديد آيد به آن تحمل دهاني Oral Tolerance گويند. به نظر مي‌رسد علاوه بر نقش تنظيمي انواع لنفوسيت‌هاي T و سايتوكين‌هاي IL10 و IL4 توليدشده توسط سلول‌هاي دندريتيك در پلاك‌هاي پير، فلور ميكروبي سطوح مخاطي نيز در ايجاد تحمل دهاني موثر باشد (۷، ۹، ۱۰).

۵- انواع آلرژي‌زاهاي غذايي

بر اساس محل تحريك سيستم ايمني و ايجاد پاسخ، دو نوع آلرژي‌زاي غذايي تعريف شده است:

۱-۵- آلرژي‌زاهاي غذايي نوع اول: اين نوع به دليل تحريك سيستم ايمني (پس از صرف غذا) باعث ايجاد پاسخ عليه مواد غذايي در روده مي‌شود. اين مواد گليكوپروتئين‌هاي محلول در آب با وزن مولكولي حدود ۱۰ تا ۷۰ كيلو دالتون است و در برابر محيط اسيدي، آنزيم‌هاي پروتئوليتيك و حرارت مقاوم‌اند.

۵-۲- آلرژي‌زاهاي غذايي نوع دوم: اين نوع داراي واكنش متقاطع به دليل تشابه ساختماني با آلرژي‌زاهاي موجود در هوا (اغلب گرده گياهان) مي‌باشند. بنابر اين مرحله اول حساس سازي افراد، برخورد با آلرژي استنشاقی است. در مرحله بعد اگر فرد از ماده خوراكي كه تشابه آنتي‌ژني با آلرژي‌زاهاي استنشاقی دارد، استفاده نمايد، اين ماده خوراكي باعث ايجاد آلرژي مي‌شود. اغلب آلرژي‌زاهاي غذايي نوع دوم، پروتئين‌هاي منشا گرفته از گياهان مي‌باشند. اين پروتئين‌ها نسبت به حرارت بسيار حساس بوده و به‌سختي قابل تخليص مي‌باشند. همين ويژگي‌ها امكان تهيه عصاره‌هاي استاندارد جهت تشخيص

آلرژی به آلرژی‌زاهای نوع دوم را مشکل می‌سازد. تعداد محدودی از آلرژی‌های نوع اول و دوم شناسایی شده و پس از تعیین توالی ژن آن‌ها توسط روش‌های مهندسی ژنتیک به صورت نو ترکیب تولید شده‌اند (۵، ۹).

بسیاری از آلرژی‌زاهای نوع دوم، دارای شباهت ساختمانی با گروه‌های پروتئینی گیاهی (PRP) Pathogen-related protein مانند پروفیلین‌ها، پروتئین‌های ذخیره‌ای حبوبات، مهارکننده‌های آنزیم‌های پروتئولیتیک مربوط به گیاهان و پراکسیدازها می‌باشند (۱۱). در کودکان بیش از ۸۵٪ از آلرژی‌زاهای غذایی گزارش شده، مربوط به شیر گاو، تخم مرغ، بادام زمینی، سویا، ماهی و گندم است. اما در بالغین، بادام زمینی، آجیل‌های مغزدار، ماهی و غذاهای دریایی مسئول ایجاد آلرژی در بیشتر افراد می‌باشند (۱۲).

۶- مراحل شکل‌گیری پاسخ آلژیک

آلرژی غذایی در افرادی که از نظر ژنتیکی مستعد می‌باشند، هنگام اختلال در تحمل دهانی روی می‌دهد. معمولاً شکل‌گیری این نوع پاسخ آلژیک در دو مرحله صورت می‌گیرد. در مرحله اول پس از ورود ماده غذایی (آلرژی‌زاهای موجود در هوا) و تحریک سیستم ایمنی علیه آلرژی‌زاهای مواد غذایی، IgE اختصاصی علیه آن‌ها تشکیل می‌شود. این IgE‌های اختصاصی به گیرنده خود روی سلول‌های ماستوسیت یا بازوفیل متصل شده و این اتصال باعث افزایش طول عمر آن‌ها (تا ماه‌ها یا سال‌ها) می‌شود. فردی که این فعل و انفعالات در بدن او شکل گرفته را فرد حساس شده یا حساس می‌نامند (۳). در مرحله دوم هرگاه فرد حساس مجدداً با آلرژنی که قبلاً با آن

تماس داشته، برخورد کند، این آلرژن غذایی پس از عبور از سد سطوح مخاطی به IgE‌های اختصاصی روی ماستوسیت‌ها یا بازوفیل‌ها متصل و باعث دگرانولاسیون آن‌ها می‌شود. پیامد این فرایند، رها شدن تعداد فراوانی از واسطه‌ها از جمله هیستامین است. این واسطه‌ها با تاثیر بر سطوح مخاطی و سایر اعضای بدن باعث ایجاد علائم بالینی آلرژی می‌شوند. تظاهرات بالینی آلرژی غذایی در بخش‌هایی همچون پوست (۶۰٪)، دستگاه گوارش (۲۰٪)، مجاری تنفسی (۲۰٪) و سیستم قلبی-عروقی (۱۵-۲۰٪) دیده می‌شود. حساسیت‌های غذایی توسط واکنش‌های وابسته به IgE، غیر وابسته به Cell mediated و به صورت مخلوط ایجاد می‌شود (۱۳، ۱۴).

۷- علائم گوارشی آلرژی غذایی:

۷-۱- علائم گوارشی وابسته به IgE

تظاهرات بالینی حساسیت غذایی وابسته به IgE در دستگاه گوارش به صورت سندرم آلرژی دهانی Oral allergy syndrome و آنافیلاکسی وابسته به دستگاه گوارش Gastrointestinal است. سندرم آلرژی دهانی در کودکان، پس از دوره شیرخوارگی و در بالغین بروز می‌نماید و علائم آن به صورت خارش ناحیه حلق و گلو، تورم لب، زبان، کام و حلق همراه با احساس خارش گوش‌ها و تنگی راه حلق می‌باشد. در آنافیلاکسی وابسته به دستگاه گوارش علائم آلرژی چند دقیقه تا حداکثر دو ساعت بعد از مصرف ماده غذایی به صورت تهوع، درد شکمی، اسهال و استفراغ بروز می‌نماید.

۷-۲- علائم گوارشی غیر وابسته به IgE

حساسیت غذایی که در اثر پاسخ‌های سلولی به پروتئین‌های غذایی ایجاد می‌شود، بر اساس سن بروز

"رجب زاده شانديز و سرايي جماب، مروري بر آلرژي هاي غذايي و روش هاي نوين شناسايي..."

۸- روش های تشخیص آلرژن ها و بررسی پتانسیل

آلرژي زايي مواد غذايي يا تركيبات تشكيل دهنده آن آلرژن هاي غذايي از طريق تركيباتي در غذا كه سبب تحريك و ايجاد واكنش هاي ايمونولوژيكي آلرژي مي شوند، قابل رد يابي هستند. در آلرژي هاي وابسته به IgE، آلرژن ها اصولاً پروتئين هايي هستند كه در غذاهاي خاصي به وفور يافت مي شوند (۱۷). تشخيص آلرژن ها در محصولات غذايي كار بسيار سختي مي باشد، چراكه اغلب آن ها در مقادير كم يا به صورت مخلوط در ماده غذايي است. حد آستانه اي كه براي واكنش هاي آلرژي زايي خاصي توسط DBPCFC (Double-Blind Placebo Controlled Food Challenges) تعيين شده است، محدوده اي بين كمتر از ۱ ميلي گرم تا بيشتر از ۱ گرم آلرژن در يك كيلوگرم ماده غذايي است (۱۸) كه مربوط به پيچيدگي ها و خصوصيات آلرژن است. نظر ديگري در رابطه با اينكه حد آستانه براي مواد غذايي مختلف بين ۱ ppm تا ۱۰۰ در هر كيلوگرم ماده غذايي باشد نيز وجود دارد (۱۹). تعيين آلرژي زايي غذايي به شدت مبتني بر IgE انساني است كه از سرم افراد حساس شده عليه يك آلرژن خاص جدا شده است. چنانچه ماده آلرژن شناسايي و خالص شود، به عنوان آنتي ژن به حيوانات آزمايشگاهي چون خرگوش، بز، جوجه يا گوسفند تزريق شده، سپس آنتي بادي توليد شده در بدن آن ها استخراج و در روش هاي ايمونولوژيكي در بررسي هاي روزانه مواد غذايي مورد استفاده قرار مي گيرد. بسياري از غذاهاي آلرژن، حاوي تعداد زيادي پروتئين آلرژن هستند كه از نظر مقدار بسيار متفاوت مي باشند. شناساگرهايي كه جهت بررسي وجود تركيبات آلرژن در مواد غذايي وجود دارند و

و محل درگيري به انواع مختلف شامل سندرم انتروكوليت، انتروپاتي و كوليت تقسيم مي شود. اين سندرم ها به طور معمولي در چند ماه اول زندگي شيرخوار ظاهر شده و علائم آن ها اغلب به صورت تحريك پذيري، اسهال و استفراغي است كه منجر به دهيدراتاسيون مكرر مي شود (۱۴، ۱۵).

۷-۳- علائم گوارشي با فرآيند مختلط

۷-۳-۱- ازوفازيت ائوزينوفيليك آلرژيك

Eosinophilic esophagitis allergic در طيف سني نوزادي تا نوجواني ديده مي شود. در اين بيماري غلظت ائوزينوفيل هاي خون در مري بالا مي رود كه به احتمال زياد در پاسخ به عوامل ايجاد كننده آلرژي است و سبب بروز عوارضي چون اشكال در بلع، تجمع غذا در مري، حالت تهوع، استفراغ و كاهش وزن مي شود.

۷-۳-۲- گاستروانترت ائوزينوفيليك آلرژيك

gastroenteritis eosinophilic allergic در هر سني بروز مي كند و علائم آن شبیه ازوفازيت ائوزينوفيليك آلرژيك بوده، اما كاهش وزن بسيار مشهود است.

۷-۳-۳- علائم پوستي

شايع ترين علامت آلرژي غذايي بروز كهير و تورم حاد است. بروز اين علائم به دليل فعال شدن ماستوسيت ها با واسطه IgE است كه به دنبال حضور آلرژن در جريان خون صورت مي گيرد.

۷-۳-۴- علائم تنفسي

معمولاً در حساسيت غذايي، علائم تنفسي به تنهائي بروز نمي كند، بلكه با علائم حساسيت در ساير اندام ها همراه است (۱۶-۱۴).

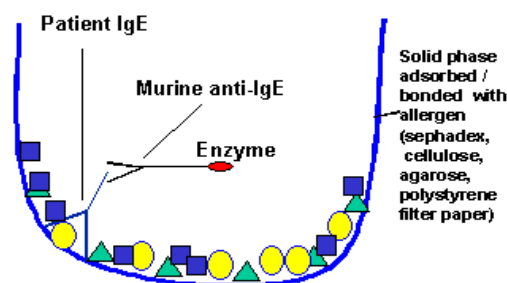
۸-۱-۱- رادیو/ آنزیم آلرژوسوربنت RAST/EAST

با روش رادیو/ آنزیم آلرژوسوربنت، IgE اختصاصی ضد آلرژن تشخیص داده می‌شود. این دو آزمون جهت تشخیص کیفی آلرژن و ارزیابی پتانسیل آلرژی‌زایی در دامنه وسیعی از مواد غذایی استفاده می‌شود (۲۱-۲۳). گزارش‌های اندکی در زمینه کاربرد رادیو آلرژوسوربنت جهت اندازه‌گیری میزان آلرژن‌ها با حد تشخیص ۱ mg/kg نیز منتشر شده است (۱۹، ۲۴). در این روش پروتئین آلرژن یا همان آنتی‌ژن روی یک فاز جامد مانند دیسک‌های کاغذی، دانه‌های سفارز یا نیترو سلولز متصل می‌شود. سپس سرم فرد بیمار با این آنتی‌ژن‌های متصل شده روی فاز جامد، مجاور شده تا در صورت وجود IgE‌های اختصاصی ضد آلرژن مزبور، به آن متصل شود. سپس برای اثبات این واکنش از آنتی‌بادی ضد IgE انسانی که با یک ماده رادیواکتیو مانند ید ۱۲۵ در رادیو آلرژوسوربنت یا یک آنزیم مانند پراکسیداز Horseradish peroxidase در آنزیم آلرژوسوربنت نشان‌دار شده است، استفاده می‌شود. در ادامه با اضافه کردن سوبسترای که تغییر رنگ می‌دهد یا نور تولید می‌کند، تشخیص نهایی میسر می‌شود. کاربردهای تجاری این دو آزمون به‌منظور تعیین آلرژن‌های مواد غذایی محدود است، چراکه استاندارد کردن این آزمون‌ها مشکل است (۲۱).

مورد استفاده هستند، معمولاً روی پروتئین خاص یا قطعه‌ای از DNA هدف‌گیری شده‌اند.

۸-۱- روش‌های مبتنی بر پروتئین

روش‌های مبتنی بر پروتئین شامل تشخیص‌های ایمونوشیمیایی هستند. اگرچه راکت ایمونوالکتروفورز Rocket immuno-electrophoresis (RIE) و ایمونوبلاتینگ Immunoblotting فقط روش کیفی و نیمه کمی است. اما رادیو آلرژوسوربنت تست-Radio RAST (allergosorbent test)، آنزیم آلرژوسوربنت تست Enzyme allergosorbent test (EAST) و الایزا Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) روش‌های کمی محسوب می‌شوند. در حال حاضر، فقط تکنیک الایزا در بررسی‌های معمولی غذایی استفاده می‌شود. آن‌هم به دلیل سهولت کار کردن و پتانسیل بالای پاسخگویی در این حوزه می‌باشد. روش‌های مبتنی بر DNA شامل تکثیر قطعه‌ای خاص از DNA با تکنیک PCR یا real-time PCR است. تکنیک اخیر نتایج کمی با دقت بالا در اختیار قرار می‌دهد. انتخاب نوع روش بستگی زیادی به نوع ماده غذایی و مراحل تولید طی می‌کند دارد. روش‌های مبتنی بر DNA و پروتئین هرکدام دارای معایب و مزایایی هستند (۲۰). در زیر به برخی از روش‌های تشخیص و اندازه‌گیری آلرژن‌های مواد غذایی اشاره شده است.

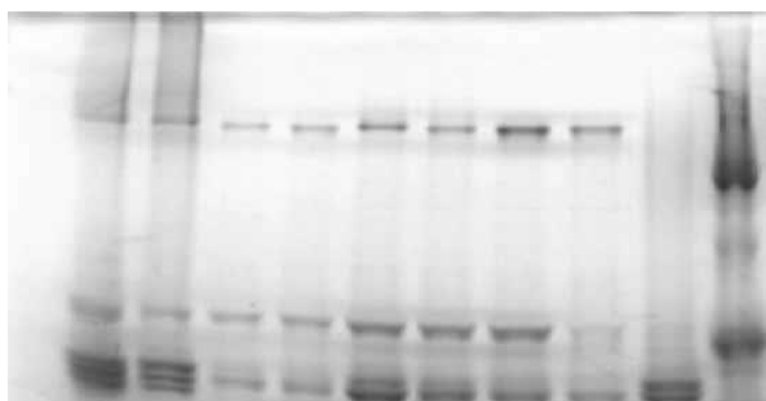


شکل ۱- شماتیک از آزمون آنزیم آلرژوسوربنت

"رجب زاده شانديز و سرامي جماب، مروري بر آلرژي هاي غذايي و روش هاي نوين شناسايي..."

غشاي ديگر منتقل و با يك آنتي بادي نشاندار شده با آنزيم يا راديواكتيو تشخيص داده مي شوند. هر باند اختصاصي بيانگر يك پروتين است. بلائينگ IgE انساني امكان تشخيص و شناسايي آلرژن هاي اختصاصي را فراهم مي کند. اين روش به ميزان وسيعي مورد استفاده است و امكان تشخيص آلرژن هاي غذايي را تا حد کمتر از ۵ mg/kg را ممکن مي سازد (۲۳). اين روش معايبي نيز دارد که پيچيده بودن، زمان بر بودن و لزوم کار کردن با سرم انساني از جمله آنهاست.

۸-۱-۲- سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel / ایمونوبلائينگ Immunoblotting انجام الکتروفورز با ژل پلی کریل آمید و استفاده از سدیم دودسیل سولفات در ایمونوبلائينگ، یک روش استاندارد جهت تفکیک و شناسايي پروتين ها يا آلرژن ها است. سدیم دودسیل سولفات پروتين را دناتوره کرده و با پوشش کامل پروتين به آن بار منفي مي دهد. پروتين ها بر اساس جرم مولکولي و بار الکتریکي که کسب کرده اند، از همدیگر تفکیک مي شوند (شکل ۲). پروتين هاي تفکیک شده به یک



شکل ۲- الگوی SDS-PAGE عصاره پروتئيني فندق (۲۲)

افزوده شده و در ادامه هيستامين آزاد شده، با واسطه نور فلورسنت توليد شده يا فعاليت راديواکتیوی، اندازه گيري مي شود. برای یک نمونه معلوم انساني، هيستامين آزاد شده متناسب با غلظت آلرژن است. حساسيت اين آزمون به اندازه RAST بوده و از طرفي در مدت زمان کوتاهی (چند ساعت) انجام پذير است. ولي انجام آن در آزمایشگاه هاي خاص و مجهز ممکن است (۲۵). اندازه گيري مقدار بتا-ان-استیل هگزوز آمینیداز β -N-acetylhexosaminidase رها شده از

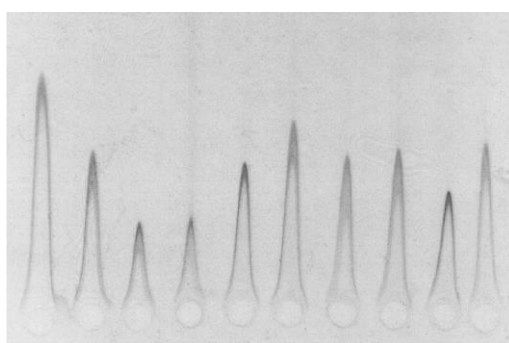
۸-۱-۳- تست اندازه گيري فاکتورهاي رها شده از سلول تحريك شده Cell response factor release assays سنجش و اندازه گيري هيستامين رها شده از بازوفيل، معمولاً جهت شناسايي آلرژن ها و غربالگري آلرژي استفاده مي شود. اين آزمون مبتني بر رها شدن هيستامين از بازوفيل هاي خون با واسطه IgE که در اثر ورود آلرژن اختصاصي، توليد شده است. در اين روش حدود ۲۰ μ l از نمونه خون تازه به عصاره آلرژن

سلول‌های ماستوسیت مخاطی، نوع دیگری از تکنیک‌های مبتنی بر سلول، جهت اندازه‌گیری پتانسیل آلرژی‌زایی مواد غذایی است (۲۶).

۴-۱-۸- راکت ایمنووالکتروفورز

در این روش از یک ژل حاوی آنتی‌بادی استفاده می‌شود. آنتی‌ژنی که قرار است بررسی شود، داخل حفراتی که در ژل تعبیه شده ریخته و بر اساس جریان

الکتریکی حرکت می‌کند، تا زمانی که کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی تشکیل و رسوب کند. رسوبات موشکی (راکت) شکل در صورتی تشکیل می‌شود که نسبت آنتی‌ژن به آنتی‌بادی، ثابت باشد. از طرفی ارتفاع پیک‌ها (راکت‌ها) با مقدار آنتی‌ژن، رابطه مستقیم دارد (شکل ۳).



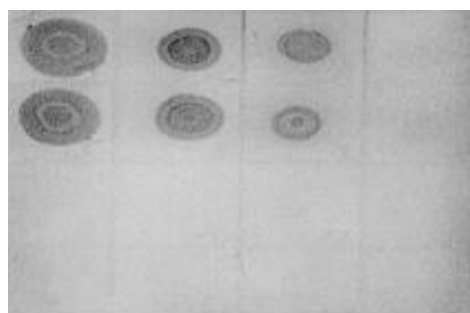
شکل ۳- نمودار راکت ایمنووالکتروفورز جهت تشخیص مقادیر متفاوت پروتئین تخم‌مرغ (۲۷)

این روش جهت تعیین چندین آلرژن مهم در محصولات غذایی با حد آستانه‌ای از ۲,۵ mg/kg تا ۳۰ استفاده شده است (۲۷). اما به دلیل پرزحمت بودن از جهت تهیه ژل و رنگ‌آمیزی چندان مورد استفاده نیست (۲۸).

۵-۱-۸- دات ایمنوبلاتینگ

این روش یک غربالگری ساده و ارزان برای نمونه‌های

غذایی است. عصاره‌های پروتئینی (آنتی‌ژن) استخراج شده از نمونه غذایی، روی یک غشای نیترو سلولزی تثبیت شده، سپس با یک آنتی‌بادی اختصاصی علیه آن پروتئین که با یک آنزیم کونژوگه شده است، به آنتی‌ژن متصل شده و مورد شناسایی قرار می‌گیرد. بعد از واکنش آنزیم-سوبسترا، محصولات رنگی به‌صورت نقاطی آشکار می‌شوند (شکل ۴).



شکل ۴- تصویر دات بلاتینگ عصاره فندق باند شده با IgE انسانی که توسط آنزیم کونژوگه با آنتی‌بادی ضد IgE شناسایی شده است (۲۹)

"رجب زاده شانديز و سرايي جماب، مروري بر آلرژي هاي غذايي و روش هاي نوين شناسايي..."

همچنين مي توان از آنتي بادي نشان دار شده با راديو اکتيو و در ادامه آناليز کردن با راديو گرافي نيز استفاده کرد. ميزان و شدت نقاط با مقدار آنتي ژن رابطه مستقيم دارد. اين يک آزمون نيمه کمي است و امکان تشخيص پروتئين هدف را با غلظت کمتر از ۲,۵ mg/kg فراهم مي کند (۳۰).

۸-۱-۶-الايزا

در حال حاضر، تکنیک الايزا معمولي ترين روش استفاده شده در آزمايشگاه هاي صنايع غذايي و آژانس هاي رسمي کنترل غذا است. به منظور تشخيص و تعيين کميّت آلرژن هاي مخفي در مواد غذايي با استفاده از آزمون الايزا، آلرژن ها يا پروتئين هاي مارکر مخصوص با واکنش رنگ سنجي در پي اتصال به آنتي بادي اختصاصي نشان دار شده با يک آنزيم، تشخيص داده مي شوند. غلظت اين کمپلکس آنتي ژن-آنتي بادي بر اساس منحنی هاي استاندارد ي زده مي شود. در اين زمينه دو تکنیک الايزاي رقابتي و الايزاي ساندويچ، بيشتر مورد استفاده است و از بين اين دو، الايزاي ساندويچ معمول تر است (۳۱). در اين روش، آنتي بادي اختصاصي روي يک سطح جامد، که معمولاً میکروپلیت های ۹۶ خانه ای هستند، ثابت شده و در ادامه پروتئين آلرژن (آنتي ژن) افزوده شده و توسط آنتي بادي ثابت شده روي بستر و آنتي بادي دوم گرفتار مي شود. در ادامه مجدداً يک آنتي بادي متصل شده با يک آنزيم که با آناليت اوليه واکنش مي دهد، افزوده مي شود. اين ساختار تشکيل حالت ساندويچ را مي دهد (يک آنتي ژن در بين دو آنتي بادي قرار مي گيرد). يک سويسترای خاص با آنزيمي که متصل به آنتي بادي دوم است، واکنش داده و يک ترکيب

رنگي توليد مي کند، که شدت رنگ با غلظت آلرژن يا آنتي ژن رابطه مستقيم دارد. بر اساس اين روش، کيت هاي تجاري مختلفی در زمينه تشخيص آلرژن هاي غذايي وارد بازار شده است (۳۲). الايزاي رقابتي براي تشخيص پروتئين هاي تقريباً کوچک استفاده مي شود، که شامل آنتي ژن هاي ثابت شده روي يک سطح جامد است. در اين روش رقابت بين دو آنتي بادي، يکي در نمونه به صورت غير نشان دار و يکي به صورت نشان دار شده با آنزيم براي اتصال به آنتي ژن متصل شده در چاهک صورت مي پذيرد. بديهي است که هر چه مقدار آنتي بادي نمونه بيشتر باشد، آنتي بادي نشان دار کم تري به چاهک ها متصل شده و سيگنال نيز کمتر خواهد بود و در نتيجه منحنی استاندارد نيز معکوس است. الايزاي رقابتي براي تشخيص برخي آلرژن هاي غذايي با حساسيت mg/kg ۰,۴ انجام شده است و تعدادي کيت تجاري در اين زمينه در بازار موجود است (۳۳). نگاه کردن به روش الايزا از جنبه هاي مختلف، در سال هاي اخير اهميت خاصي پيدا کرده است. از جمله ديپ استيک تست ها Dipstick tests يا تست هاي نواري که بسيار ارزان، سريع و قابل انتقال اند، به ابزار خاصي نياز نداشته و از نظر انجام بسيار ساده هستند. در حال حاضر اين تست ها فقط کيفي هستند، اما يک نمونه توسعه يافته از اين آزمون در مورد تخم مرغ، اختصاصيت و حساسيت بالايي تا حد اندازه گيري مقادير mg/kg ۰,۰۲ از آلرژن زايي اين ماده غذايي را نشان داده است (۳۴).

۸-۲-روش هاي مبتني بر DNA

۸-۲-۱-واکنش زنجيره اي پليمراز Polymerase chain reaction (PCR)
روش هاي مبتني بر DNA به طور روزافزون، جهت

تشخیص ترکیبات بیگانه در مواد غذایی مانند میکروب‌های بیماری‌زا، محصولات تراریخته و بررسی حضور آلرژن‌های غذایی استفاده می‌شود. جهت تعیین و تشخیص آلرژن‌های غذایی، این روش بسیار اختصاصی بوده و ابزار حساسی در این زمینه است. اما نتایج به‌دست آمده بیانگر در معرض قرار گرفتن با آلرژن واقعی نیست. چراکه فرایندهای فرآوری ماده غذایی، پروتئین‌های آلرژن‌ها و DNA را دچار تغییراتی می‌کند و آن‌ها را به قطعات مختلفی تبدیل می‌کند، که منجر به نتایج زیادی در زمینه حضور آلرژن‌های مختلف در ماده غذایی می‌شود. علی‌رغم این محدودیت‌ها، روش‌های مبتنی بر DNA نسبت به روش‌های مبتنی بر پروتئین مزایای زیادی دارد. اول این‌که DNA استخراج‌شده از مواد غذایی کمتر از پروتئین‌های استخراج‌شده، دچار تغییر می‌شود و دیگر این‌که پایداری DNA تحت شرایطی چون تغییرات فصلی و جغرافیایی نسبت به پروتئین‌ها بیشتر است (۳۵). نتایج به‌دست‌آمده با این روش، یعنی تکثیر یک قطعه خاص از DNA به همراه دو پرایمر و یک پلیمرز مقاوم حرارتی فقط کیفی است، اما با به‌کارگیری استاندارد داخلی نتایج نیمه کمی نیز می‌توان به دست آورد.

۸-۲-۲- پی‌سی‌آر در لحظه Real-time PCR

این تکنیک نیازمند تجهیزات پیچیده‌تری است، اما بسیار دقیق بوده و نسبت به سایر روش‌های مبتنی بر DNA کم‌زحمت‌تر است. در این روش از کاوشگرهای هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسنت در انتهای ۳' یا ۵' استفاده می‌شود، که امکان بررسی میزان محصول PCR را بدون جداسازی آن‌ها و روش‌های الکتروفورز در ژل آگارز یا ژل

پلی‌اکریل‌آمید می‌دهد. تمامی اصول و واکنش‌گرهایی که برای یک PCR معمولی نیاز است، در این تکنیک هم بکار می‌رود. اما یک گزارشگر فلورسنت نیز در واکنش حضور دارد. این گزارشگرها طوری طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر DNA، نور تولید می‌کنند. لذا افزایش شدت نور تولید شده در دستگاه با میزان محصول به‌دست آمده نسبت مستقیم دارد. با ادامه یافتن PCR شدت فلورسنت رو به افزایش می‌گذارد (۳۶).

۳-۲-۸- پی‌سی‌آر-الایزا PCR-ELISA

این روش اختصاصیت بالای روش‌های مبتنی بر DNA را با روش‌های نسبتاً ساده و تجاری الایزا تلفیق کرده و یک روش نیمه کمی است. در این روش یک قطعه خاص از DNA آلرژن غذایی تکثیر می‌شود. سپس این قطعه تکثیرشده، به یک پروتئین خاص که با پروب DNA کونژوگه شده، متصل می‌شود. در ادامه همین پروتئین با یک آنتی‌بادی کونژوگه شده با یک آنزیم نیز اتصال برقرار می‌کند. غلظت DNA توسط فعالیت رنگی ایجاد شده از واکنش سوبسترا-آنزیم قابل اندازه‌گیری است.

۹- بیوسنسورها

فناوری دیگری که هنوز به‌طور گسترده در حوزه تشخیص آلرژن‌های غذایی وارد نشده است، استفاده از بیوسنسورها است. با استفاده از این ابزار می‌توان واکنش مولکولی اختصاصی را در هر زمان واقعی، اندازه‌گیری کرد. با تثبیت مولکول هدف که ممکن است یک آنتی‌بادی، پروتئین و یا یک قطعه DNA تکرشته‌ای باشد، به سطح تراشه حسگر واکنش اتصالی بین یک یا چند مولکول می‌تواند به‌صورت کمی اندازه‌گیری شود. در این تکنیک نیازی به

"رجب زاده شانديز و سرايي جماب، مروري بر آلرژي هاي غذايي و روش هاي نوين شناسايي..."

نشان دار کردن مولکولها با یک رنگ فلئورسنت یا ماده رادیواکتیو نیست. بلکه اندازه گیری مقدار و تشخیص با اندازه گیری میزان ضریب شکست همراه است. نکته حائز اهمیت در این آزمون، زمان کوتاه آنالیز و میزان بالای خودکار سازی آن است (۳۷). بیوسنسورها قادرند برای تشخیص یک آلرژن خاص، پروتئین و یا یک قطعه DNA خاص استفاده شوند. این تکنیک جهت بررسی پتانسیل آلرژیک ذرات غذایی چون تخم مرغ، شیر و فندق استفاده می شود (۳۸).

نتیجه گیری

در آلرژیک های غذایی فرد نسبت به ترکیبات غذایی خاص مانند پروتئین ها حساسیت پیدا کرده و واکنش سیستم ایمنی به طور خفیف یا شدید، حتی ممکن است موجب حمله های آنافیلاکتیک (شوک حساسیتی) شده و در نهایت منجر به مرگ شود. در حال حاضر بهترین روش جلوگیری از بروز آلرژیک غذایی، ممانعت از مصرف ماده غذایی آلرژیک از طریق توافقات مصرف کنندگان است. در همین راستا طبق توافقات بین المللی، کلیه تولید کنندگان محصولات غذایی موظف اند ترکیبات بکار رفته در تولید و فرآوری ماده

غذایی را بر روی محصول تولیدی درج کنند، تا مصرف کننده نسبت به مصرف آنچه می خورد اطلاع کامل داشته باشد. اما این کافی نیست و ابداع و به کارگیری آزمون هایی که بتوان انواع مختلف ترکیبات آلرژن را قبل از مصرف شناسایی کرد نیز لازم و ضروری به نظر می رسد. در حال حاضر عمده روش های شناسایی ترکیبات آلرژن مواد غذایی به دو دسته مختلف تقسیم می شود. در یکی تشخیص پروتئین عامل آلرژیک و در دیگری شناسایی DNA ترکیبات آلرژیک مد نظر است در همین راستا روش های آزمایشگاهی مختلفی ابداع و به کارگیری شده اند که گاهی حساسیت بالایی داشته و قادرند ترکیبات آلرژن را در محدوده تعیین شده توسط مجامع رسمی و بین المللی (کمتر از ۱ میلی گرم تا بیشتر از ۱ گرم در هر کیلو گرم ماده غذایی یا بین ۱ ppm تا ۱۰۰) تشخیص دهند. علاوه بر این کیت های تجاری متعددی با کاربری آسان و سریع نیز به بازار عرضه شده است و تلاش ها برای ورود فناوری های نوین به این عرصه هم چنان ادامه دارد.

References

فهرست منابع

- 1- Varasteh, A. Jabbari, F. Sankian, M. (2008) Food allergy. Science Journal of Birjand medical University, 15, number 2
- 2- Allen, KJ. Hill, DJ. Heine, RG. (2006) Food allergy in Childhood. MJA practice essentials- Allergy, 185: 394-400.
- 3- Varasteh, AR. Ghassemi, R. (2008), Introduction and history in Food allergy. 1st ed. Tehran: Payvand Mehr: 1-5.
- 4- www.qums.ac.ir.
- 5- Sampson, AH. (2003) Food allergy. J Allergy Clin Immunol, 111: 540-547.
- 6- Bochner, B, BW. (2004) Advances in mechanisms of allergy. J Allergy Clin Immunol, 113.

- 7- Helm, R, BW (2000) Mechanisms of food allergy Current opinion in immunology. Curr Opin Immunol 12: 647-653
- 8- Jaffuel, D. Demoly, P. Bousquet, J. (2001). Les allergies alimentaires. Rev Fr Allergol Immunol Clin,41: 169-186.
- 9- Rici, MH. Burks, W. (2000) Mechanisms of food allergy. Curr Opin Immunol. 12: 647-653.
- 10- Ring, J. Brockow, K. Behrendt, H. (2001) Adverse reactions to foods. J Chromatography. 756: 10-30.
- 11- Kelso, JM. (2000) Pollen-food allergy syndrome. Clinical and experimental Allergy, 30: 905-907
- 12- Cordle, TC. (2004) Soy Protein allergy: Incidence and relative severity. J Nutr,134: 1213-1219.
- 13- Adverse Foods Reactions Committee, (1999). Diagnostic methodology in food allergy. Allergol Immunol Clin, 14:50-62.
- 14- Bush, RK. Taylor, SL. (2013) Reactions to Food and Drug Additives. Middleton's Allergy: Principles and Practice: Eighth Edition: Elsevier Inc.
- 15- Behrman, RE. Kliegman, RM. Jenson, HB. (2003) Allergic Disorders. Nelson Textbook of Pediatrics. 17th ed. St. Louis: Mosby: 747-792.
- 16- Taylor, SL. Hefle, SL. (2006) Food allergen labeling in the USA and Europe. Current opinion in allergy and clinical immunology 6: 186-190.
- 17- Taylor, S. (1992) Chemistry and detection of food allergens. Food Technology ۴۶: 146-152.
- 18- Taylor, SL. Hefle, SL. Bindslev-Jensen, C. Bock, SA. Burks, AW Jr. Christie, L. Hill, D J. Host, A. Hourihane, JO. Lack, G. Metcalfe, DD. Moneret-Vautrin, DA. Vadas, PA. Rance, F. Skrypec, DJ. Trautman, TA. Yman, IM. Zeiger, RS. (2002), Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 109: 24-30.
- 19- Koppelman, SJ. Knulst, AC. Koers, WJ. Penninks, AH. Peppelman, H. (1999) Comparison of different immunochemical methods for the detection and quantification of hazelnut proteins in food products. Journal of immunological methods 229:107-120.
- 20- Poms, R. Klein, C. Anklam, E. (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. Food additives and contaminants 21: 1-31.
- 21- Nordlee, JA. Taylor, SL. (1995), Immunological analysis of food allergens and other food proteins. Food Technology, 2:129-132
- 22- POMS, RE. Anklam, E. (2004) Trends in detecting food allergens. GIT laboratory journal Europe 8: 43-46.
- 23- Scheibe, B. Weiss, W. Ruëff, F. Przybilla, B. Görg, A. (2001) Detection of trace amounts of hidden allergens: hazelnut and almond proteins in chocolate. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 756: 229-237.
- 24- Fremont, S., Kanny, G., Bieber, S., Nicolas, J. P., & Moneret-Vautrin, D. A. (1996). Identification of a masked allergen, α -lactalbumin, in baby-food cereal flour guaranteed free of cow's milk protein. Allergy, 51(10), 749-754.
- 25- Holgate, ST. Church, MK. Lichtenstein, LM. (2001) Allergy, 2nd edn., (St Louis: Mosby).
- 26- Yamanishi, R., Tsuji, H., Bando, N., Yoshimoto, I., & Ogawa, T. (1997). Micro-assay method for evaluating the allergenicity of the major soybean allergen, Gly m Bd 30K, with mouse antiserum and RBL-2H3 cells. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 61(1), 19-23.
- 27- Yman, I. M., Eriksson, A., Everitt, G., Yman, L., & Karlsson, T. (1994). Analysis of food proteins

"رجب زاده شانديز و سرايى جماب، مرورى بر آلرژى هاى غذايى و روش هاى نوين شناسايى..."

- for verification of contamination or mislabelling. *Food and Agricultural Immunology*, 6(2), 167-172.
- 28- **Besler, M. Kasel, U. Wichmann, G. (2002b)** Determination of hidden allergens in foods by immunoassays [<http://www.food-allergens.de>]. Internet Symposium on Food Allergens, 4: 1-18.
- 29- **Koch, P. Scha, ppi, GF, Poms. R E, Wu. thrich, R. Anklam, E., Battaglia, R., (2003)** Comparison of commercially available ELISA kits with human sera-based detection methods for peanut allergens in foods. *Food Additives and Contaminants* (in press)
- 30- **Blais, B. W., & Phillippe, L. M. (2000)**. A cloth-based enzyme immunoassay for detection of peanut proteins in foods. *Food and agricultural immunology*, 12(3), 243-248.
- 31- **Hlywka, J. J., Hefle, S. L., & Taylor, S. L. (2000)**. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of almonds in foods. *Journal of food protection*, 63(2), 252-257.
- 32- **Hefle, S. L., Jeanniton, E., & Taylor, S. L. (2001)**. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of egg residues in processed foods. *Journal of Food Protection*, 64(11), 1812-1816.
- 33- **Roux, KH. Teuber, SS. Robotham, JM. Sathe ,SK. (2001)** Detection and stability of the major almond allergen in foods. *Journal of agricultural and food chemistry* ۴۹: ۲۱۳۱-۲۱۳۶
- 34- **Baumgartner, S., Steiner, I., Kloiber, S., Hirmann, D., Krska, R., & Yeung, J. (2002)**. Towards the development of a dipstick immunoassay for the detection of trace amounts of egg proteins in food. *European Food Research and Technology*, 214(2), 168-170.
- 35- **Malorny, B., Tassios, P. T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M., & Hoorfar, J. (2003)**. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International journal of food microbiology*, 83(1), 39-48.
- 36- **Chen, Y., Perkins, M. D., Teixeira, L., Cave, M. D., & Eisenach, K. D. (1998)**. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 36(7), 1964-1968.
- 37- **Elliot, Ch., (2002)**, Optical Biosensors: from a research idea to an analytical necessity. Proceedings of the 3rd Joint CSL/JIFSAN Symposium on food Safety and Nutrition, York, UK.
- 38- **Jonsson, H. (2002)** Sensitive and specific biosensor detection of hazelnut proteins and other allergens in food: proceedings TNO International Food Allergy Forum (Noordwijkerhout, The Netherlands). TNO.

A review of food allergies, and new ways to identify them in food

Safia Rajabzadeh Shandiz *¹, Mahboobeh Sarabi Jamab²

1. Phd of microbiology of food industry, Mashhad Science and Technology Institute, Iran
2. Department of Biotechnology, Food Industry, Mashhad Science and Technology Research Institute, Iran

Safieh.rajabzadeh@gmail.com

Abstract

Food allergy is an overreaction of the immune system to certain foods or substances that usually are safe and the production of IgE antibodies is quite evident. This is usually caused by allergic reactions to food proteins that are specific immunological responses. A number of specific clinical syndromes that occur as a result of a food allergy include anaphylactic shock, Asthma and atopic dermatitis associated with food allergies. Food ingredients that stimulate the immunological and cause allergic reactions, are traceable. The detection of allergens in food products can be very difficult. Reactions determined by double-blind placebo controlled food challenges (DBPCFC) range between less than 1 mg and more than 1 g of allergenic protein in 1 Kg/food depending on the food concerned and the sensitivity of selected allergic individuals. Today the major existing techniques, DNA-based identification of parts or components of the fusion protein allergens that each has advantages, disadvantages and different applications. Immunochemical diagnosis usually involves protein-based methods and ELISA is the most famous of this. On the other hand, in DNA-based methods, duplicating a particular piece of DNA is done by use of the heat resistant polymerase and two primers.

Key words: Food Allergy, Allergens, IgE antibody, DNA based method, Protein based method