# Colofon

|  |  |
| --- | --- |
| Afbeeldingsresultaat voor huijbregts  Meesterproef  Technasium | Gina de Groot en Sanne Bennenbroek  Varendonck College |

School

Varendonck College

Telefoon: 0493 672 672

Adres: Beatrixlaan 25, 5721 LZ Asten

Projectleden

Gina de Groot

Telefoon: 06 15336061

E-mailadres: [gina.de.groot@hotmail.com](mailto:gina.de.groot@hotmail.com)

Sanne Bennenbroek

Telefoon: 06 25347248

E-mailadres: [sannebennenbroek@gmail.com](mailto:sannebennenbroek@gmail.com)

Groep e-mailadres: [Technasiumvdc.gns@gmail.com](mailto:Technasiumvdc.gns@gmail.com)

Begeleider

Neeltje van de Vossenberg

Telefoon: 06 53525215

E-mailadres: [n.vd.vossenberg@varendonck.nl](mailto:n.vd.vossenberg@varendonck.nl)

Opdrachtgever

Bob Meijer

Telefoon: 06 41676877

E-mailadres: [bobm@huijbregts.nl](mailto:bobm@huijbregts.nl)

Expertbegeleider

Lena Coremans

Telefoon: 06 27251935

E-mailadres: [lena.coremans@student.fontys.nl](mailto:lena.coremans@student.fontys.nl)

# Voorwoord

Dit verslag is geschreven in het kader van de meesterproef voor de opleiding Technasium. Dit is een examenonderdeel. Wij hebben onze meesterproef gemaakt voor het bedrijf Huijbregts te Helmond. Gedurende dit project hebben we ons beziggehouden met allergenen en de werking van deze eiwitten.

Wij, Gina en Sanne, hebben samen het vooronderzoek geschreven. Het hoofdstuk specifieke allergenen hebben we wel verdeeld. Gina heeft het hoofdstuk over gluten geschreven en Sanne heeft het stuk geschreven over het melkeiwit. Het werkplan hebben we vervolgens weer samen uitgewerkt. Een experiment en de verwerking hebben we ook samen uitgevoerd.

Ten eerste willen we onze opdrachtgever Bob Meijer bedanken, dankzij hem hebben we deze opdracht uit kunnen voeren. Lena Coremans, de expertbegeleider, willen we ook graag bedanken voor de hulp die we hebben gekregen. Judit András heeft ons geholpen met de ELISA test, hiervoor zijn we haar ontzettend dankbaar. Ze heeft ons alles goed uitgelegd en de resultaten mee verwerkt. Neeltje van de Vossenberg was onze begeleidster vanuit school en haar willen we natuurlijk ook bedanken. Ze heeft ons zo veel mogelijk proberen te helpen. Als laatste willen we ook Marie-José Lodewijks bedanken voor het vervoer naar Huijbregts.

Inhoud

[Colofon 0](#_Toc34992961)

[Voorwoord 2](#_Toc34992962)

[Samenvatting 5](#_Toc34992963)

[1. Inleiding 6](#_Toc34992964)

[2. Achtergronden 7](#_Toc34992965)

[2.1 Huijbregts 7](#_Toc34992966)

[2.2 Opdrachtgever 7](#_Toc34992967)

[3. Opdracht 8](#_Toc34992968)

[4. Allergenen 9](#_Toc34992969)

[4.1 Wettelijke allergenen 9](#_Toc34992970)

[5. Allergische reactie 10](#_Toc34992971)

[5.1 Betrokken cellen bij een allergische reactie 10](#_Toc34992972)

[5.2 Werking van een allergische reactie 10](#_Toc34992973)

[6. Allergie types 12](#_Toc34992974)

[6.1 Type 1 12](#_Toc34992975)

[6.2 Type 2 13](#_Toc34992976)

[6.3 Type 3 13](#_Toc34992977)

[6.4 Type 4 14](#_Toc34992978)

[6.5 Conclusie allergie types 14](#_Toc34992979)

[7. Uitleg allergie type 1 15](#_Toc34992980)

[8. Intolerantie 16](#_Toc34992981)

[9. Specifieke allergenen 17](#_Toc34992982)

[9.1 Gluten 17](#_Toc34992983)

[9.1.1 Tarwe allergie 17](#_Toc34992984)

[9.1.2 Coeliakie 17](#_Toc34992985)

[9.1.3 Glutensensitiviteit 18](#_Toc34992986)

[9.1.4 Gliadinen en gluteninen 19](#_Toc34992987)

[9.1.5 Gluteneiwitten 19](#_Toc34992988)

[9.2 Melkeiwitten 20](#_Toc34992989)

[9.2.1 Caseïne 20](#_Toc34992990)

[9.2.2 Wei-eiwit 21](#_Toc34992991)

[10. Voorbereiding onderzoek 23](#_Toc34992992)

[10.1 ELISA 23](#_Toc34992993)

[10.1.1 Sandwich- ELISA 23](#_Toc34992994)

[10.1.2 Competitive- ELISA 23](#_Toc34992995)

[10.1.3 Indirect-ELISA 24](#_Toc34992996)

[10.1.4 Direct-ELISA 25](#_Toc34992997)

[10.2 RIDA Quick Gliadin 25](#_Toc34992998)

[11. Werkplan 26](#_Toc34992999)

[11.1 Competitive ELISA test 26](#_Toc34993000)

[11.1.1 Benodigdheden 26](#_Toc34993001)

[11.1.2 Voorbereiding experiment 27](#_Toc34993002)

[11.1.3 Uitvoering experiment 27](#_Toc34993003)

[11.1.4 Resultaten 27](#_Toc34993004)

[11.1.5 Verwerking 28](#_Toc34993005)

[11.2 RIDA Quick Gliadin test 28](#_Toc34993006)

[11.2.1 Benodigdheden 28](#_Toc34993007)

[11.2.2 Uitvoering experiment 28](#_Toc34993008)

[12. Resultaten en verwerking 29](#_Toc34993009)

[12.1 Competitive ELISA 29](#_Toc34993010)

[12.1.1 Algemeen 29](#_Toc34993011)

[12.1.2 Absorptie 30](#_Toc34993012)

[12.1.3 Bepaling concentraties 31](#_Toc34993013)

[12.1.4 Monsters poeder 32](#_Toc34993014)

[12.1.5 Monsters oppervlakte 33](#_Toc34993015)

[12.2 RIDA Quick Gliadin 34](#_Toc34993016)

[13. Advies 35](#_Toc34993017)

[14. Discussie 36](#_Toc34993018)

[Nawoord 37](#_Toc34993019)

[Literatuurlijst 38](#_Toc34993020)

# Samenvatting

Deze meesterproef is uitgevoerd voor het bedrijf Huijbregts. Dit is een bedrijf in Helmond wat poeders en grondstoffen mengt. Deze mengsels worden vervolgens getransporteerd naar andere bedrijven. Huijbregts moet ervoor zorgen dat tijdens het mengen van stoffen geen kruisbesmetting kan plaatsvinden.

Aan het begin van deze meesterproef is een literatuuronderzoek gedaan. Dit bevatte onderzoek naar de werking allergieën en naar de betekenis van allergenen. Een allergie is een afweerreactie van het lichaam. Bij sommige mensen worden mestcellen geactiveerd door lichaamsvreemde stoffen, ook wel allergenen genoemd. Hier komt histamine bij vrij en dit leidt tot de klachten van een allergie. Allergenen zijn eiwitten die in de dagelijkse voeding voorkomen.

Er is ook onderzoek gedaan naar twee specifieke allergenen, namelijk gluten en melkeiwitten. Het allergeen gluten is gekozen omdat dit in van de meest voorkomende allergieën is. Het melkeiwit is gekozen omdat een melkallergie vaak wordt verward met lactose-intolerantie. Uit het onderzoek is gebleken dat gluten uit gliadine en gluteninen bestaan. Melkeiwitten bestaan ook uit verschillende soorten eiwitten waar mensen allergisch voor kunnen zijn. Deze eiwitten zijn onder te verdelen in caseïne en wei-eiwitten. Van deze twee eiwitten zijn er ook weer verschillende soorten.

Tijdens deze meesterproef is er een test gedaan. Deze test bestond uit het analyseren van gemengde producten en mogelijk besmette oppervlaktes op de aanwezigheid van gluten. De geteste oppervlaktes zijn: een met tarwebloem besmette ijzerplaat, de schep en het werkoppervlak Dit is getest, omdat een bedrijf als Huijbregts aan zijn klanten moet kunnen garanderen dat er geen kruisbesmettingen plaats kunnen vinden.

Er is gekeken naar de verschillende ELISA testen, om te bepalen welke test uitgevoerd moest worden. Tijdens het experiment bij Huijbregts is er gebruik gemaakt van een ELISA Competitive test. Deze test werkt met antilichamen die zich binden aan de wanden als er geen gliadine in de monsters zitten. Als er wel gliadine in de oplossing zit, binden de antilichamen aan de gliadine in het monster en niet aan de wand.

Na het experiment bij Huijbregts zijn de gegevens verwerkt. Hieruit bleek dat er in tarwebloem een zeer hoge concentratie gluten is aan te tonen. Bij de monsters van de poeders uit de machines was de uitslag negatief. Dit wil zeggen dat er geen gluten aanwezig waren. Naast de poeders is ook een oppervlakte getest, namelijk een schep waarmee de poeders uit het machine zijn gehaald. De besmette oppervlakte met tarwebloem was positief en hiermee zijn de waardes van de schep vergeleken. De uitslag van de monsters van de oppervlakte was ook negatief.

Uit deze resultaten kan er geconcludeerd worden dat de reinigingsmethodes van Huijbregts goed werken en dat ze goede en zuivere producten leveren aan hun klanten. Huijbregts laat zien dat ze verantwoordelijk omgaan met de producten die ze hun klanten aanleveren.

Er kan wel gediscussieerd worden over de uitvoering van de ELISA Competitive test. Uit de cijfers is gebleken dat de concentratie van gluten in de monsters niet gelijk was aan 0. De concentratie zat wel onder een bepaalde waarde die onnauwkeurigheden indekt.

Hoe het komt dat de concentratie gluten niet gelijk was aan 0 zou kunnen komen door de manier van pipetteren. Tijdens de laatste stap van de test zou het kunnen zijn dat de pipet de wand van de microwell heeft aangeraakt. Dit heeft ervoor kunnen zorgen dat de gliadine aan de wand is losgelaten en in het monster terecht is gekomen. Dit kan gecontroleerd worden door herhaalonderzoeken met dezelfde monsters

# Inleiding

Wanneer je naar de verpakking van een product kijkt en er staat dat het product geen gluten bevat, weet je eigenlijk altijd wel zeker dat er geen gluten in zitten. Bij het bedrijf Huijbregts controleren de medewerkers regelmatig hun eigen producten. Deze meesterproef is uitgevoerd bij Huijbregts met de opdracht om een poedermix te controleren of er misschien kruisbesmetting plaats heeft kunnen vinden.

Huijbregts is een bedrijf in Helmond dat grondstoffen mixt. Ze maken dus geen producten maar zorgen er voor dat andere bedrijven de juiste mengsels krijgen. Ze mengen veel verschillende grondstoffen en ze moeten ervoor zorgen dat er geen kruisbesmetting plaats vindt.

Deze meesterproef is het examenonderdeel voor de extra opleiding Technasium. Gina de Groot en Sanne Bennenbroek hebben deze meesterproef uitgevoerd op vwo-niveau. Gina en Sanne hebben deze meesterproef gekoppeld aan hun profielwerkstuk. Het begin van het literatuuronderzoek komt overheen met het literatuuronderzoek voor het profielwerkstuk. Het profielwerkstuk ging over de erfelijkheid van allergieën.

Voordat de controletesten uitgevoerd konden worden, is er een literatuuronderzoek uitgevoerd. Als eerste in het verslag kan je het onderzoek naar allergieën lezen. In deze hoofdstukken staat beschreven wat allergieën zijn en hoe allergenen reageren in het lichaam. Vervolgens zijn er twee allergenen uitgebreid onderzocht, namelijk gluten en melkeiwitten. Deze allergenen staan beschreven in hoofdstuk 9. Voor het kiezen van de test die het beste uitgevoerd kon worden, zijn er verschillende ELISA testen beschreven en vergeleken. Deze testen staan beschreven in hoofdstuk 10. In hoofdstuk 11 is de voorbereiding voor de test beschreven. De test die is uitgevoerd is de Competitive ELISA test. De verwerking en de uiteindelijke resultaten staan beschreven in hoofdstuk 12. Aan de hand van de resultaten is er een advies voor het bedrijf Huijbregts geschreven in hoofdstuk 13. Als laatste is er een korte discussie geschreven in hoofdstuk 14.

# Achtergronden

## Afbeeldingsresultaat voor huijbregtsHuijbregts

Figuur . Logo Huijbregts

In ruim 80 jaar tijd is Huijbregts Groep uitgegroeid van een lokaal familiebedrijf naar een internationale marktleider. Maar het familiegevoel blijft.   
   
2.1.1 Poedermengsels voor slagerijen   
In 1936 startte Wim Huijbregts een bedrijf in Eindhoven. Hij begon met het mengen van mixen voor regionale slagerijen. De mixen werden onder andere gebruikt in worst- en gehaktproducten. In de jaren ’70 maakte het bedrijf een enorme groei door. Er kwam een nieuwe productielocatie in Helmond.   
   
2.1.2 Poeder voor levensmiddelenindustrie   
In december 1980 nam zijn zoon, Frans Huijbregts, het bedrijf van zijn vader over. Hij wilde grote vernieuwingen doorvoeren en een andere koers in slaan. De ambachtelijke slagerij was immers naar de achtergrond aan het verdwijnen en de vleesindustrie kreeg de overhand. Huijbregts stopte met de productontwikkeling en richtte zich op poeders voor de levensmiddelenindustrie. Onder leiding van Frans werden hoogwaardige technologische innovaties doorgevoerd. Denk hierbij aan de slimme robot die alle stoffen naar de goede plek rijdt, of aan de verschillende schoonmaak methodes en protocollen. Vanaf 2019 is Willem Huijbregts, de derde generatie, de directeur van het bedrijf.

Het bedrijf doet er alles aan om de voedselveiligheid te waarborgen, ook al verwerken ze geen producten maar mixen ze alleen grondstoffen. Hierbij kijken ze vooral naar de allergenen en eiwitten. Om een goed allergenenbeleid te kunnen voeren hanteren ze de volgende maatregelingen:

* Geen verwerking van noten, pinda’s, lupine of sesam in het gehele bedrijf
* Kruisbesmettingsvraagstukken meetbaar maken met eiwitbenadering
* Beheer van actuele allergenen gegevens van verwerkte grondstoffen in systeem inclusief aanvullende eiwit-gegevens per grondstof, per allergeen.

## 2.2 Opdrachtgever

De opdrachtgever van dit project is Bob Meijer. Hij is afgestudeerd als biochemisch laborant, maar werkt tegenwoordig bij Huijbregts als Quality Assurance. Hij gaat over de kwaliteit van de producten die Huijbregts koopt, verkoopt en hun equipement.

Verder start hij vaak projecten op met studenten van verschillende scholen. Hij kijkt dan waar de interesses van de leerlingen liggen en bedenkt hiervoor een opdracht. Zijn vakgebied is namelijk zo breed dat er altijd wel een aansprekende opdracht te vinden is.

# Opdracht

Dit project bestaat uit verschillende deelopdrachten en deelvragen.

Als eerste wordt er een literatuuronderzoek gedaan naar allergenen en eiwitten. Hierbij wordt gekeken waaruit deze stoffen bestaan en hoe deze kunnen werken/reageren. Dit is belangrijk omdat er later gekeken wordt naar de eiwit- en allergeenbepaling. Hierbij wordt ook gekeken naar hoe het menselijk lichaam reageert op de allergenen. Hieruit moet blijken hoe een allergische reactie ontstaat.

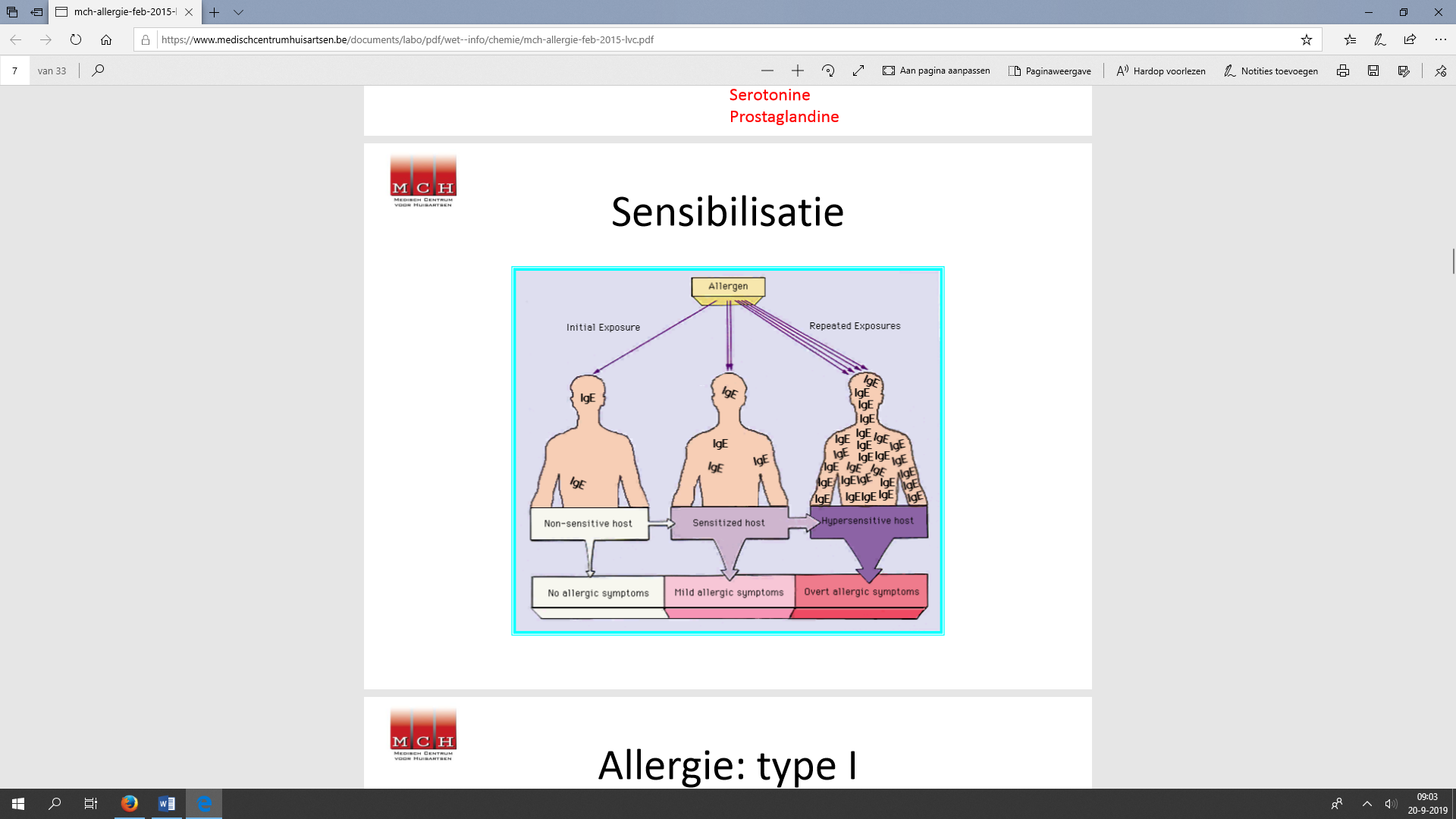
De volgende deelopdracht is het onderzoeken van de poedermixen uit de productie en oppervlaktes (monsters) die worden schoongemaakt bij de reiniging van Huijbregts. Huijbregts heeft meerdere laboratoria waar de stoffen worden onderzocht. De vraag die hieruit voortkomt is of de monsters ook echt schoon zijn, of worden de allergenen juist doorgegeven waardoor de allergeenvrije poeders besmet raken door eerdere gemixte producten waar wel allergenen in zitten.

Dit wordt onderzocht door monsters te nemen van poeders en swaps te nemen van de des betreffende oppervlaktes. Deze monsters worden onderzocht en uit deze resultaten kan een conclusie worden getrokken.

# Allergenen

Om te weten hoe een allergie werkt moet er eerst gekeken worden naar de betrokken factoren. De allergenen zijn de veroorzakers van een allergie en worden in dit hoofdstuk toegelicht.

In het onderzoek van prof.dr. Bruijnzeel-Koomen, dr. Knulst en prof.dr. De Monchy staat beschreven hoe allergenen reageren in het lichaam (2008). Allergenen zijn namelijk eiwitten waar het immuunsysteem niet tolerant voor is. De meeste mensen zijn tolerant voor deze eiwitten, maar mensen die dit niet zijn hebben dus hiervoor een allergie.

De eiwitten die kunnen reageren als allergenen komen in contact met het immuunsysteem via de luchtwegen en/of via de darmen. Deze allergenen kunnen dan reageren met de IgE-antistoffen in het lichaam, wanneer deze aanwezig in het lichaam zijn. De IgE-antistoffen zijn de stoffen die ervoor zorgen dat iemand allergisch is voor bepaalde eiwitten. Wanneer deze stoffen in het lichaam zijn, hoeven ze niet meteen een allergische reactie te veroorzaken. Er is alleen geen duidelijke reden waarom iemand met de IgE-antistoffen niet reageert met het allergeen en iemand anders die ook in het bezit is van de antistoffen wel klinische symptomen krijgt.

Het ligt natuurlijk ook aan wat de concentratie van de IgE-antistoffen in het lichaam is. Hoe meer IgE-antistoffen in het lichaam aanwezig zijn, hoe sneller en heftigere reacties kunnen plaats vinden.

Figuur 2. Het IgE-antistof

Daarom kan iemand met de aanwezigheid van de IgE-antistoffen wel een keer een allergische reactie krijgen en andere keer niet.

Dit wordt verder uitgelegd in hoofdstuk 5.

## 4.1 Wettelijke allergenen

Volgens allergenen consultancy (2017) zijn er in de Europese wetgeving 14 allergenen benoemd:

* Gluten (tarwe, rogge, gerst, spelt, haver, en khorasantarwe)
* Schaaldieren
* Vis
* Ei
* Soja
* Pinda
* Melk (incl. lactose)
* Noten (8 verschillende soorten)
* Mosterd
* Selderij
* Sesam
* Sulfiet
* Lupine
* Weekdieren

De meeste van deze allergenen moeten vermeld staan op bijvoorbeeld verpakkingen.

# Allergische reactie

Een allergie is een overdreven sterke afweerreactie van het lichaam op een bepaalde stof, denk hierbij aan bacteriën, eiwitten of bepaalde stoffen van dieren en planten. Deze stoffen vallen allemaal onder een vakterm, namelijk allergenen. Wat deze allergenen precies zijn staat in de vorige paragraaf van dit verslag. In deze paragraaf wordt er beschreven wat er gebeurt met een allergische reactie en hoe deze ontstaat.

## 5.1 Betrokken cellen bij een allergische reactie

Afbeelding met tekst, kaart

Automatisch gegenereerde beschrijvingUit het onderzoek van Bergkamp (2011) blijkt dat tijdens een allergische reactie er verschillende afweercellen actief zijn. Als eerst zijn er de macrofagen (letterlijk: grote eter). Deze fagocyt, die bij het niet-specifieke afweer hoort, valt alle niet lichaamseigen stoffen aan en vernietigd deze. Wanneer deze allergenen zijn vernietigd, presenteert de macrofaag het allergeen aan de T-helpercellen. Deze cellen worden aan elkaar gekoppeld door het MHC-II eiwit. Dit eiwit hebben alleen lichaamseigen stoffen, dus hierdoor is het goed te herkennen welke stoffen de allergenen zijn.

Figuur 3 . De gevoeligheid voor een allergie

De T-helpercellen zijn cruciaal voor het afweersysteem. Deze cellen zorgen ervoor dat de cytotoxische T-cellen worden geactiveerd. Deze cellen zijn er op hun beurt weer om de geïnfecteerde lichaamscellen te herkennen en te vernietigen. Ook kan de T-helpercel de B-cellen activeren om, net als de macrofagen, de allergenen te vernietigen, maar deze cellen kunnen ook geheugencellen maken waardoor een mogelijke tweede besmetting niet plaats zou kunnen vinden.

## 5.2 Werking van een allergische reactie

Bergkamp (2011) beschrijft ook dat de B-cellen en de T-helpercellen de allergenen herkent wanneer de allergenen in het bloed terecht komen. De B-cellen gaan de antistoffen maken, deze cellen herkennen deze stof namelijk, want die is vaker in het bloed voorgekomen en kan daardoor snel antistoffen aanmaken.

Er worden IgE-antistoffen gemaakt die zich gaan hechten aan mestcellen in de slijmvliezen. Door deze antistoffen kan er snel een binding gemaakt worden tussen het allergeen en de antistof. Dit is ook te zien in Figuur 3. Deze antistof is namelijk specifiek gemaakt voor dat allergeen. Wanneer een antistof het allergeen dus heeft herkend, zet de mestcel zich uit en scheidt histamine uit. Dit zorgt ervoor dat bloedvaten zich verwijden, de gladde spieren gaan samentrekken en de slijmproductie toeneemt. Dit zorgt dus voor benauwdheid, rode ogen, verstopte neus en buikpijn.

Wanneer de gebonden immunoglobuline E aan het binnendringende allergeen bindt, wordt de degranulatie veroorzaakt, oftewel een allergische reactie plaats vinden. Dit kan plaats vinden in de:

* Huid
* Membranen van het oog
* Neus
* Mond
* Luchtwegen
* Darmkanalen
* Basofiele granulocyten in de bloedbaan

Degranulatie is het afgeven van bepaalde, in blaasjes, granulen, verpakte stoffen door een cel naar de omgeving rondom de cel. Hieruit ontstaat vervolgens een specifieke reactie.

# Allergie types

In 2019 zijn de vier verschillende types van allergieën beschreven op het Nederlands Anafylaxis Netwerk. Type 1, 2 en 3 zijn IgE gemedieerd, dit houdt in dat deze allergische reacties worden veroorzaakt doordat de IgE-antistoffen in het lichaam aanwezig zijn. Bij type 4 is het cellulair gemedieerd, dit houdt in dat

Volgens het Maxima medisch centrum (2019) zijn type 2 en 3 gerelateerd aan medicatie, dus een geneesmiddelenallergie.

## 6.1 Type 1

Dit type allergie wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van de immunoglobuline E, deze zijn verbonden aan de mestcellen. De reactie vindt plaats wanneer het gebonden IgE-molecuul zich aan het binnendringende allergeen bindt, hierdoor vindt er degranulatie plaats.

Na de degranulatie komen er chemische stoffen vrij, bijvoorbeeld:

* Histamine
* Ontstekingscellen (eosinofiele granulocyten)

Dit type is ook het onmiddellijke reactietype, dit komt doordat de reactie optreedt na 5 tot 10 minuten wanneer de persoon in contact komt met het allergeen.

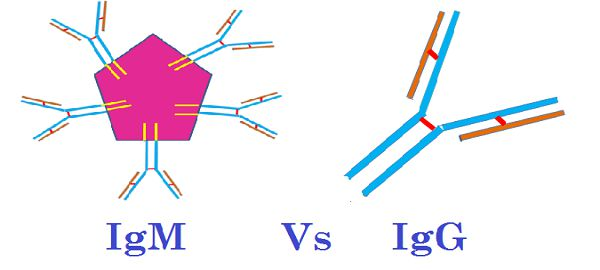
Kijk verder bij hoofdstuk 7.

Er zijn ook een aantal bepalende factoren die ervoor zorgen wat de ernst is van de klinische verschijnselen:

* Hoogte van de IgE-spiegel
* Intensiteit van de blootstelling aan het allergeen
* Duur van de blootstelling aan het allergeen
* De gevoeligheid van het doelorgaan
* Gevoeligheid van de mestcellen die ervoor zorgen dat de vrijgave van de mediatoren wordt geactiveerd

## 6.2 Type 2

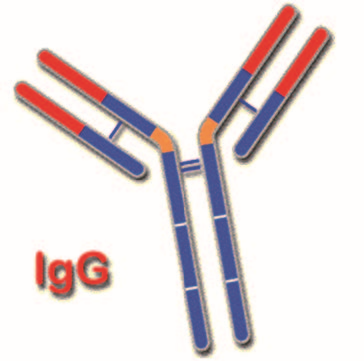
Dit type wordt ook wel de cytotoxische allergie genoemd. Rachna (2017) beschreef in dat deze reactie plaats vindt wanneer het antigeen in contact komt met het cel gebonden antistoffen IgG of IgM. Door deze reactie vindt er Lysis, oftewel cel afbraak, plaats.



Figuur 4. Het verschil tussen het IgG en IgM antistof

IgM is een polymeer dat reageert het snelst reageert wanneer het in contact komt met een antigeen. Dit komt doordat dit polymeer tien bindingsplaatsen heeft. Ze kunnen echter niet allemaal tegelijk verbonden zijn met een antigeen omdat er anders sterische hindering plaats vindt.

IgG is een ‘typische antistof’. Dit antistof bestaat uit één variabele en één constant gebied, dit zijn de twee disulfidebruggen die zich bevinden in het lichte gebied (aangegeven in Figuur 5 met de rode cirkels). Deze verbindingen vormen een peptide lus, met een zeer gelijksoortige structuur.



Figuur 5. Het antistof IgG met de disulfidebruggen

## 6.3 Type 3

Dit type wordt ook wel de immuuncomplex ziekte genoemd. Hierbij stromen de antigenen e n antistoffen van het type IgG en IgG door het bloed en hierdoor ontstaan de immuuncomplexen. Dit houdt in dat het antigeen is gekoppeld aan het IgG antilichaam. Hierdoor kunnen deze immuuncomplexen worden verwijderd door de rode bloedcel.

Bij deze reactie ontstaan na 6 tot 8 uur allergeen klinische verschijnselen. Deze reactie komt ook voornamelijk voor bij allergische reacties op geneesmiddelen.

## 6.4 Type 4

Dit is een cellulaire allergie, waarbij het allergeen reageert met gesensibiliseerde T-lymfocyten. Dit type wordt ook wel het vertraagd type allergie genoemd, dit komt doordat het ontstekingsfiltraat zich na 24 tot 48 uur ontwikkeld.

De T-lymfocyten activeren de reactie. Deze maken diverse cytokinen aan die het betreffende antigeen kunnen elimineren.

Deze reactie komt voornamelijk voor door contact tussen allergenen en de huid. De symptomen hiervan kunnen bijvoorbeeld huidziektes en eczeem zijn.

## 6.5 Conclusie allergie types

Er wordt met deze meesterproef voornamelijk gekeken naar type 1. Dit komt doordat dit type worden veroorzaakt doordat de allergenen in contactkomen met het immuunsysteem door de luchtwegen en darmkanalen.

Dit is niet van toepassing bij type 2, 3 en 4.

# Uitleg allergie type 1

Biologiepagina (2019) heeft een animatie gemaakt met daarin uitgelegd wat er gebeurt bij een allergische reactie. In Figuur[[1]](#footnote-1) 6 is te zien hoe de macrofaag met de T-helpercel bindt en zo de informatie over het allergeen doorgeeft. In Figuur 7 is de mestcel met de antigenen te zien. In deze cellen zijn granulen opgeslagen die histamine bevatten. Die histamine komt vrij wanneer er een allergeen met de antistoffen op de mestcel bindt. Dit is te zien op Figuur 8. In Figuur 9 is te zien hoe histamine reageert met de histaminereceptoren op de bloedvaten. Door deze reactie verwijden de bloedvaten en dit kan vervelende gevolgen hebben. Om dit te voorkomen kunnen er antihistamine stoffen op de receptoren gaan zitten. Dit is te zien in Figuur 10.





Figuur 7. De mestcel met de antistoffen

Figuur 6. De antigeen presenterende cel laat het allergeen zien aan de T-helpercel



Figuur 9. Histamine bindt aan de histaminereceptoren aan de bloedvaten

Figuur 8. Het histamine komt vrij



Figuur 10. Antihistamine aan de receptoren

# Intolerantie

Wat is intolerantie eigenlijk? Intolerantie heeft niet te maken met het afweersysteem zoals een allergie. Volgens Vondermans (2016) heeft het te maken met een te kort aan enzymen. Dankzij deze enzymen kunnen grote moleculen worden afgebroken tot ze kunnen worden opgenomen in het bloed. Zonder enzymen gaat de vertering dus een stuk trager, dit zorgt voor buikpijn en winderigheid.

Ook een tekort aan transporteiwitten. Deze eiwitten zorgen voor het transport tussen de cellen. Zonder de eiwitten krijgen de cellen dus niet of niet genoeg voedingsstoffen en dit zorgt weer voor buikpijn, een opgeblazen gevoel of diarree.

# Specifieke allergenen

Om het onderzoek beter uit te kunnen voeren, wordt er gekeken welke allergenen vaak voorkomen bij Huijbregts. Deze allergenen worden hieronder benoemd en verder toegelicht.

## 9.1 Gluten

Na het in aanraking komen van gluten zijn er drie verschillende reacties die in het lichaam plaats kunnen vinden, dit zijn:

* Tarwe allergie
* Coeliakie
* Glutensensitiviteit

### 9.1.1 Tarwe allergie

In 2018 beschreef Dr. van de Merwe dat er geen allergie is waarop mensen allergische symptomen krijgen na het in aanraking komen met gluten, wel met tarwe. Deze mensen kunnen dus wel gluten binnenkrijgen, als er geen contaminatie met tarwe heeft plaatsgevonden. Glutenallergie bestaat dus niet, het is een intolerantie. Bij een glutenintolerantie wordt de reactie ook niet veroorzaakt door het immuunsysteem, maar door de darmen. Het is dus niet hetzelfde.

Wanneer je last hebt van een tarwe allergie, reageert het immuunsysteem op een van de vier eiwitten die in tarwe zitten. Dit zijn:

* Globuline
* Albumine
* Prolamine
* Gluteline

Maar voornamelijk wordt de allergie veroorzaakt door gluboline en albumine.

### 9.1.2 Coeliakie

Volgens darmgezondheid wordt vaak de glutenallergie in de war gehaald met glutenintolerantie. Glutenintolerantie, ook wel coeliakie genoemd, houdt in dat de gluten beschadigingen maken in het darmslijmvlies. Om dit verder toe te lichten, de darmcellen reageren op het gluten en wordt de darmwand ‘glad’. Dit houdt in dat de darmplooien verdwijnen. Er ontstaan ‘gaten’ in het darmepitheel, deze ontstaan omdat door deze gaten de antilichamen de darmen binnen kunnen komen. De lymfocyten zien deze gluten namelijk als een infectie en reageert hier daarom ook op deze manier op. Deze gaten in het darmepitheelzorgen ervoor dat deze kapot gaan. Dit kapot gaan van de darmplooien, wordt ook wel vlokatrofie genoemd. Het eten kan dus niet op de juiste manier worden verteerd en dit leidt tot buikpijn en diarree, hierdoor krijg je dus minder voedingsstoffen binnen.

Figuur 11. Het gezonde darmepitheel tegenover het effect van coeliakie op het darmepitheel

Volgens Gilissen Broeck heb je coeliakie als je bepaalde HLA-antigenen, oftewel erfelijke eiwitten, op het membraan van kern houdende cellen en bloedplaatjes zitten. Er zijn twee HLA-antigenen die dit kunnen veroorzaken, namelijk HLA-DQ2 en HLA-DQ8.

Voorafgaand aan het HLA-onderzoek wordt er gekeken of IgA- of IgG-antistoffen in het lichaam aanwezig zijn. Wanneer deze testen negatief zijn, maar de patiënt heeft wel last van de symptomen van de atypische vorm is coeliakie al uitgesloten.

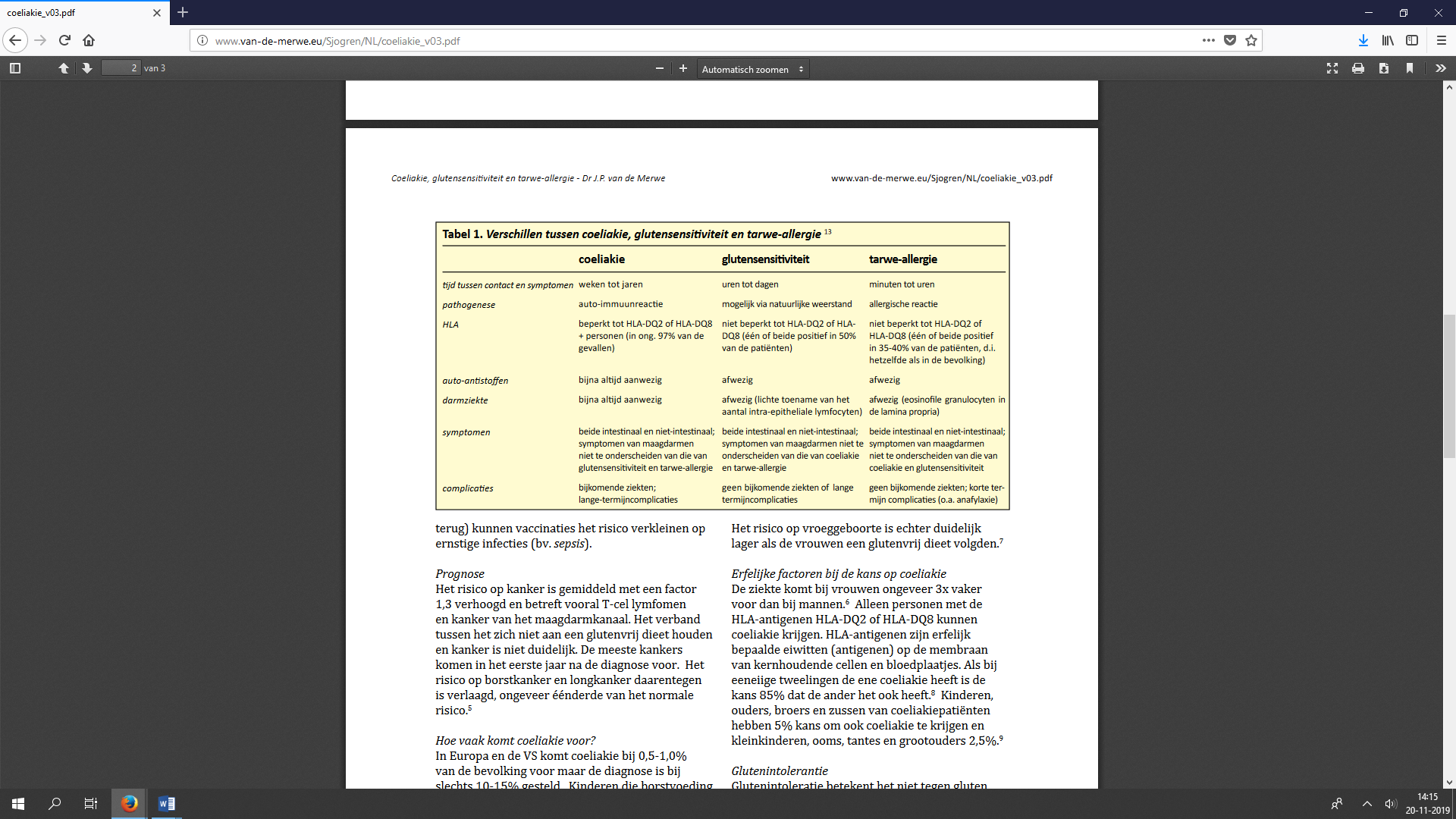
Volgens Dr. van de Merwe wordt coeliakie verdeeld in verschillende categorieën, hierbij zijn ook de oorzaken en symptomen opgesomd:

* Klassieke vorm
  + Vlokatrofie
  + Malabsorptie
* Atypische vorm
  + Vlokatrofie
  + "Mildere" klinische verschijnselen zoals: ijzergebrek, botontkalking, groeistoornis en/of onvruchtbaarheid.
  + Deze vorm komt het vaakst voor.
* Stille vorm:
  + Vlokatrofie zonder klachten. (Bijvoorbeeld ontdekt n.a.v. coeliakie in de familie)
* Potentiële vorm:
  + Antistoffen maar met een normaal dunnedarmbiopt.
  + Vaak gevonden doordat familieleden ook coeliakie hebben.
* Latente vorm:
  + Goede reactie op een glutenvrij dieet, na blootstelling aan gluten heeft de patiënt geen last van vlokatrofie.
  + Ontwikkeling op latere leeftijd passende afwijking van coeliakie.

### 9.1.3 Glutensensitiviteit

De maagleverdarmstichting beschreef dat bij glutensensitiviteit geen HLA-DQ2 of HLA-DQ8 aanwezig zijn, maar de verschijnselen zijn hetzelfde als coeliakie. Dit komt doordat de hoeveelheid van de intra-epitheliale lymfocyten (IEL) in de darmen verhoogd kan zijn. De intra-epitheliale lymfocyten zijn speciale afweercellen in de darmwand, deze cellen vormen een laag tussen de darmwand en de darminhoud. De IEL’s zorgen ervoor dat virussen, bacteriën en andere gevaren de darmwandcellen niet kunnen aantasten.

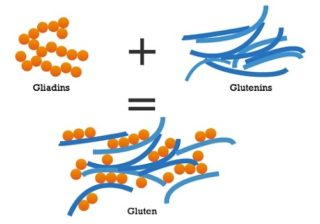
Wanneer de laag dus ‘te dik’ is, zijn er dus meer IEL’s die geactiveerd kunnen worden. De antilichamen die reageren met het gluten activeren dus die IEL’s. Deze vernietigen dus vervolgens het darmepitheel en heb je dus een glutensensitiviteit.



Tabel 1. Overzicht tarwe-gerelateerde voedselovergevoeligheid

### 9.1.4 Gliadinen en gluteninen

Weegels beschreef in 1994 dat gluten bestaan uit twee eiwitten: gliadinen en gluteninen. Deze eiwitten hebben allebei andere eigenschappen waardoor ze samen een goed mengsel vormen.

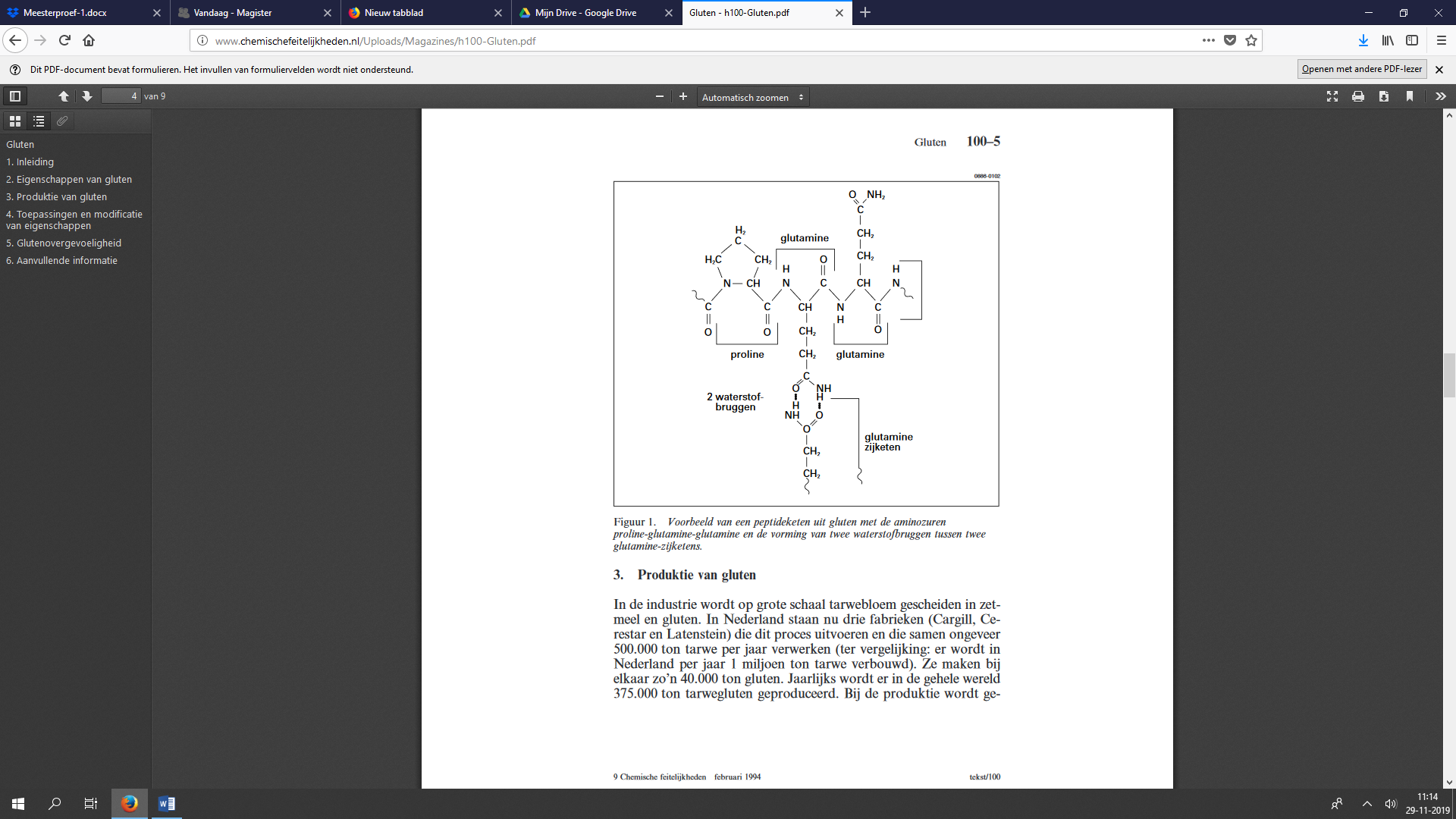
Ten eerste de gliadinen. Zij zorgen voor de stroperigheid van het gluten. Gliadinen zijn opgebouwd uit 250 tot 600 aminozuren en zij zijn globulair van vorm. Dit houdt in dit de gliadinen bolvormig is.

Figuur 12. Gliadine en gluteline

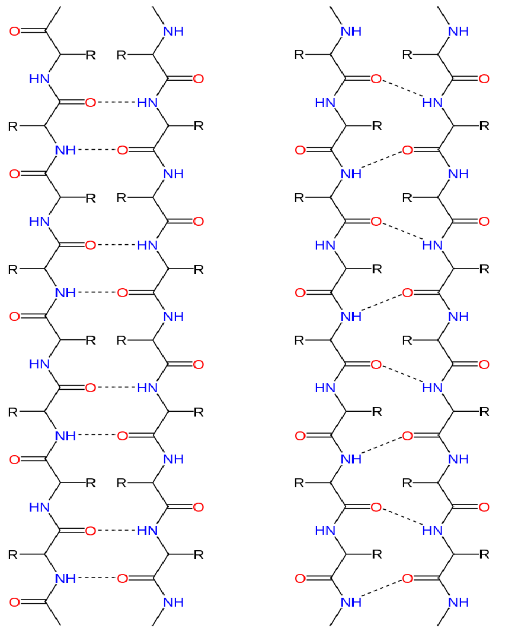
De gluteninen zorgen voor de elasticiteit van het gluten. Zij zijn opgebouwd uit 500 tot 1000 aminozuren en zij zijn staafvormig. Dit is ook te zien in Figuur 12. Deze 1000 aminozuren zijn onderling met een covalente kop-staart verbinding verbonden, waardoor er een groot netwerk wordt gevormd.

In Figuur 12 is ook te zien dat de gliadinen werken als een weekmaker. Dat houdt in dat gliadinen additieven zijn en dat zij een glijmiddel zijn waardoor de gluteninen nog elastischer zijn.

### 9.1.5 Gluteneiwitten

Volgens Weegels (1994) zijn de eiwitten waaruit gluten bestaan best bijzonder. Ze bestaan namelijk maar uit 2 aminozuren; glutamine (35-45%) en proline (12-20%). Bovendien bestaat glutamine onder andere uit twee stikstofatomen, terwijl de meeste eiwitten er maar één heeft.

Twee glutaminemoleculen kunnen twee waterstofbruggen vormen, de N en de O kunnen waterstofbruggen vormen. Dit staat onderaan in Figuur 13 aangegeven met een rode cirkel. Deze waterstofbruggen zorgen ervoor dat de gebonden glutaminemoleculen bij elkaar geheel vormen.

Zoals bekend is de bindingsenergie van waterstofbruggen gering ten opzichte de bindingsenergie van atoom-, ion- en metaalbinding. De waterstofbrugvorming is wel een belangrijke bindende factor, dit komt doordat er veel waterstofbruggen tussen de glutaminen gevormd kunnen worden. De glutaminen ‘plakken’ als het ware aan elkaar en hierdoor wordt het dus een geheel. Een voorbeeld van een eiwit met waterstofbruggen is te zien in Figuur 14.

Figuur 13. Glutamine en proline

Gluten zijn apolair doordat de bindingen tussen de eiwitten zo sterk zijn. Het eiwitnetwerk is zo sterk dat er eiwitten geen waterstofbruggen met het water kunnen vormen en dus niet kunnen oplossen. Bovendien hebben de eiwitten geen dipoolmoment, ze heffen elkaar op.

Figuur 14. Waterstofbruggen tussen eiwitten

## 9.2 Melkeiwitten

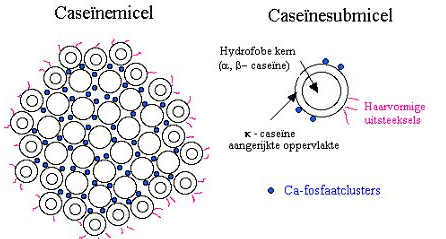
Een melkallergie is iets anders dan lactose-intolerantie. Lactose is een koolhydraat die wordt afgebroken doormiddel van lactase, het enzym dat zorgt voor de afbraak. Lactose wordt ook wel koemelksuiker genoemd. Dit verwijst dus weer naar het feit dat dit geen eiwit en dus ook geen allergeen zou kunnen zijn, dit staat beschreven in hoofdstuk 8.

In koemelk zitten ook eiwitten die daadwerkelijk kunnen zorgen voor een allergische reactie. Sterker nog, de melk bestaat voor 3,5% uit eiwitten. De eiwitten die hierin zitten bestaan voor 80% uit caseïne-eiwit en voor 20% uit wei-eiwit. Het verschil tussen de twee is dat de caseïne langzaam verteerd wordt door het menselijk lichaam en het wei-eiwit wordt relatief snel verteerd.

Volgens onderzoek van stichting voedselallergie zijn de klachten die bij deze allergieën voorkomen zijn voor een groot gedeelte hetzelfde. Deze klachten zijn:

* Huidklachten
* Galbulten;
* Eczeem;
* Luchtwegklachten:
* Astma-aanval;
* Hoesten;
* Niezen;
* Ontstoken neusslijmvliezen;
* Maag- en darmklachten:
* Diarree;
* Buikpijn;
* Misselijkheid;
* Verstopping;
* Ontsteking;

### 9.2.1 Caseïne

Volgens onderzoek uit 2019 van de Universiteit van Leuven is caseïne het belangrijkste eiwit dat in melk voorkomt. Dit eiwit zorgt ervoor dat de melk gaat klonteren als het over de datum gaat. Dit komt door de structuurformule van het eiwit. Het eiwit is opgelost als de pH redelijk neutraal is, namelijk 6,7. Naarmate de melk langer blijft staan, daalt de pH door de bacteriën die melkzuur produceren. Hierdoor gaat de caseïne klonteren.

Figuur 15. Opbouw van caseïne

Ook Cornelis G. de Kruif, Thom Huppertz, Volker S. Urban en Andrei V. Petukhov (2012) bevestigen dan caseïne komt voor in micellen. Dit zijn kleine bolletjes bestaande uit moleculen die opgelost kunnen worden in water. De buitenkant van deze bolletjes bestaan uit hydrofiele koppen van de moleculen. Deze onderdelen lossen goed op in water omdat ze polair zijn.

De binnenkant bestaat uit hydrofobe staarten van de caseïne. Deze delen lossen niet op in water en keren daarom naar elkaar toe. Dit is te zien in Figuur 15.

Er zijn verschillende soorten caseïne. Het verschil zit bij de soorten aminozuren. De drie soorten zijn alfa-caseïne, bèta-caseïne en kappa-caseïne. De alfa- en bèta-caseïne bevatten een fosfaatgroep en zijn vooral gelegen aan de binnenkant van de micel. De buitenkant van de micel bestaat uit kappa-caseïne. Omdat de kappa-caseïne aan de buitenkant van de micel zit, is dit ook het enig deeltje dat een polaire kop heeft. De andere twee caseïne deeltjes zijn totaal apolair en dus hydrofoob.

Een micel bestaat uit verschillende submicellen. De submicellen die aan de binnenkant van de grote micel zitten, bevatten alleen de alfa- en bèta-caseïne. Deze kleine bolletjes zitten aan elkaar door calciumionen. Deze ionen maken sterke verbindingen met de fosfaatgroepen.

Caseïne zorgt in het menselijk lichaam voor het behoud van de spieren. Veel sporters nemen hier tabletten van in voor het slapen gaan. Dit zorgt ervoor dat er ’s nachts geen spieren worden afgebroken. Caseïne is een eiwit dat veel leucine bevat. Dit is een aminozuur die mensen zelf niet aan kunnen maken, dus ze zullen deze uit het voedsel moeten halen.

Als iemand allergisch is voor caseïne dan is dit voor het bèta eiwit. Vooral baby’s hebben last van deze allergie. Dit komt doordat hun maagdarmstelsel nog niet optimaal werken. Ook van dit bèta eiwit zijn er twee soorten. De A1- en A2 bèta-caseïne. De A1 soort is de boosdoener bij een allergie. Deze soort wordt overigens niet aangemaakt door elke koe of andere melk makende dieren. Door de revolutie is er een mutatie ontstaan onder sommige koeien soorten en die maken dus het A1 eiwit aan. De A1 soort is een groter en ingewikkelder molecuul dan de A2 en daarom ook lastiger te verteren.

### 9.2.2 Wei-eiwit

Figuur 16. Tertiaire structuur BLG

Wei is dus het snel op te nemen eiwit dat in melk voorkomt. Ook is dit het meest bestelde supplement door sporters. Er zijn een heleboel verschillende wei-eiwitten, maar het meest voorkomende allergeen is het Bèta-lactoglobuline (BLG). Dit eiwit is te zien in Figuur 16. Opmerkelijk is dat volgens het onderzoek van Milk and Health (2017) deze allergie meer voorkomt bij kleine kinderen terwijl de caseïne allergie vaker voorkomt bij volwassenen. Omdat dit een minder ingewikkeld molecuul is, is het niet hittebestendig. Daarom worden vaak warm gemaakte melkproducten wel getolereerd.

Ook zeggen zij dat door deze eigenschap dit allergeen alleen in rauwe melk voor komt, dus melk die niet bewerkt is. De meeste melkproducten die in de winkel liggen zijn gepasteuriseerd. Dit houdt in dat de melk boven de 72°C is geweest. Hierdoor is dus de BLG niet meer werkzaam en dus is het ongevaarlijk voor mensen met een allergie voor deze stof.

P. Kelly, G.W. Smithers zeggen dat de stof deel is van de lipocaline familie. Dat betekent dat het allergeen goed oplost in vette substanties zoals olie. Melk is van nature ook een vette vloeistof. In dit vet zit dus het allergeen opgelost.

Figuur 17. Tertiaire structuur met reactieve ruimte

Het eiwit is opgebouwd uit verschillende aminozuren:

* 22 leucine-aminozuren;
* 10 isoleucine-aminozuren;
* 9 valine-aminozuren.

Met deze aminozuren is het een van de rijkste eiwitten. In Figuur 17 is te zien dat er een ruimte zit in het molecuul. (Het polymeer dat getekend is, behoort niet tot het werkelijke eiwit.) In deze ruimte kunnen vetzuren of hydrofobe smaakstoffen binden.

# Voorbereiding onderzoek

In dit hoofdstuk wordt een voorbereiding gemaakt, zodat de ELISA test beter uitgevoerd kan worden. Er zijn verschillende aspecten waar vooraf naar wordt gekeken en vervolgens benoemd in dit verslag. Deze aspecten worden hieronder opgesomd.

## 10.1 ELISA

ELISA staat voor Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay. De ELISA-testmethode bestaat uit antistoffen. Deze antistoffen binden via ion-bindingen, waterstofbruggen of vanderwaalsbindingen aan het allergeen. Deze bindingen zijn afhankelijk van het soort allergeen. Elke antistof heeft maar een soort allergeen waar hij aan kan binden. Dit zorgt voor een goede specifieke afweer. Dit staat verder uitgewerkt in hoofdstuk 5. De ELISA test werkt dus met deze eigenschappen.

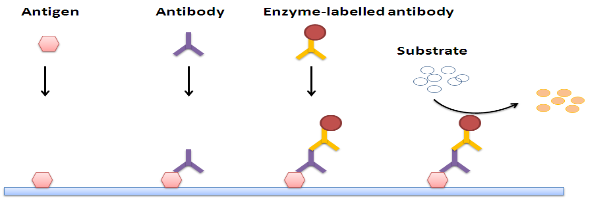
Er zijn veel verschillende ELISA testen. Sommige testen zijn voor het aantonen van meerdere allergenen tegelijk en er zijn ook testen voor maar een soort allergeen. Bij de antistoffen is ook een enzym gekoppeld. Dit enzym kan ook specifieke reacties aan gaan en zorgt voor de kleuromslag tijdens een reactie. Dankzij de kleur is dus te achterhalen of er een allergeen in de stof aanwezig is.

Er worden voor dit onderzoek vier ELISA-testen bekeken. Deze staan hieronder beschreven.

### 10.1.1 Sandwich- ELISA

Bij de Sandwich-ELISA worden de antistoffen gebonden aan de intacte eiwitten, waarbij er twee grote fragmenten zijn. Deze grote fragmenten moeten dan ook weer ten minste twee bindingsplaatsen hebben.

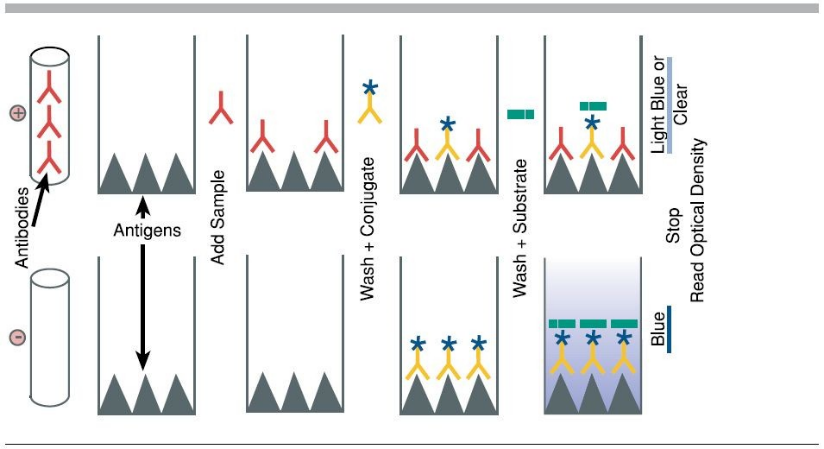
Het voordeel van deze test is dat het heel specifiek is, omdat er twee antilichamen binden aan één allergeen. Doordat de antilichamen op twee verschillende plekken van het allergeen binden, kunnen ook lastige monsters worden onderzocht.

Een nadeel aan de sandwich test is, dat het veeleisende design van deze test ook tegen kan werken. Het kan lastig zijn om twee antistoffen te hebben die allebei kunnen binden op verschillende plekken van het allergeen. Deze samenwerking tussen antistoffen kan lastig zijn. 

Figuur 18. Schematische weergave van de sandwich ELISA

### 10.1.2 Competitive- ELISA

Deze soort ELISA test wordt gebruikt tijdens het experiment. De competitive-ELISA kunnen grote en de kleine allergenen aan de antistoffen binden. Deze eiwitten hoeven dan ook maar één bindingsplaats te hebben. De competitive-ELISA kan ook voor bewerkte producten worden gebruikt, omdat er dus maar één bindingsplaats nodig is om het allergeen aan te tonen. Dit is niet het geval bij de Sandwich-ELISA. Bij de competitive-ELISA geldt wanneer de concentratie van het antigeen hoger is, hoe zwakker het uiteindelijke signaal.



Figuur 19. Schematische weergave van de competitive ELISA

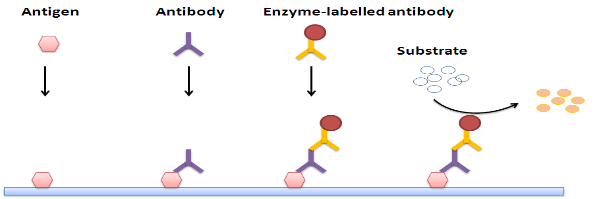
Als eerst wordt het antilichaam geïncubeerd met de allergenen in het monster. Daarna wordt het antistof-allergeencomplex toegevoegd aan de 96-plaat die zijn bedekt in hetzelfde allergeen. Hierna wordt de plaat gewassen en zullen alle ongebonden antistoffen uit de oplossing gehaald worden. Hoe meer allergenen er in de oplossing zitten, hoe minder antistoffen aan de wand zullen binden. Dit verklaart ook waarom een oplossing met weinig antistoffen, het meest verkleurt.

Daarna wordt er een antistof met een gelinkt enzym toegevoegd die alleen kan binden aan de eerste antistof. Als laatst wordt er een substraat toegevoegd. Dit substraat zorgt ervoor dat het enzym een fluoriserende kleur afgeeft aan de oplossing. Dit is terug te zien in Figuur 19.

### 10.1.3 Indirect-ELISA

De indirect ELISA is een test bestaande uit twee stappen. Hier zijn twee soorten bindingen bij betrokken met ook twee antistoffen. De eerste antistof en een gelabelde antistof. De eerste antistof bindt aan het allergeen en deze antistof wordt weer verbonden aan de gelabelde antistof.

Maar bij deze test is de kans aanwezig dat de gelabelde antistof zich bindt aan verkeerde delen.



Figuur 20. Schematische weergave van de indirect ELISA

### 

### 10.1.4 Direct-ELISA

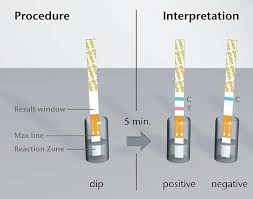
Bij de direct ELISA zitten de allergenen ook vast aan de microwells. Bij de andere testen worden er meerdere antilichamen toegevoegd om aan te tonen of er allergenen in de oplossing zitten. Bij deze test wordt dit echter niet gedaan. Hier wordt maar een antilichaam toegevoegd die Direct aan het allergeen bindt. Dit is tevens ook het gelabelde antilichaam. Dus het allergeen bindt meteen met het gelabelde antilichaam dat de kleur aan de oplossing geeft.

Figuur 21. Schematische weergaven van de direct ELISA

## 10.2 RIDA Quick Gliadin

RIDA Quick Gliadin wordt gebruikt om te bepalen of er gluten aanwezig zijn op een oppervlakte. Er moeten swabs van de oppervlakte genomen worden en deze moeten vervolgens aan een buffer worden toegevoegd. De test strips waarmee de swabs afgenomen worden, bevatten het R5 antilichaam. Dit antilichaam kan dus vervolgens binden aan de gliadine. Wanneer er een binding is gevormd, ontstaat er een rode streep op de teststrip. Dit is te zien in Figuur 22.

Er ontstaat ook een blauwe streep, deze streep geeft aan dat er een test is uitgevoerd.



Figuur 22. Werking RIDA Quick Gliadin test

# Werkplan

Tijdens het experiment wordt gebruik gemaakt van de ELISA competitive test en de RIDA Quick Gliadin test. Het doel van dit experiment is het onderzoeken of er gluten (gliadine-moleculen) op de instrumenten van Huijbregts aanwezig zijn.

De Competitive test is het meest geschikt omdat hiermee ook ruwe en vervuilde allergenen kunnen worden aangetoond. Deze eigenschap is nodig omdat de producten die mogelijk allergenen kunnen bevatten, bewerkt zijn tot gedroogde poeders. Hierdoor zijn ook de allergenen aangetast en zouden ze dus niet meer op te sporen zijn met een andere ELISA test. Dit werkplan is geschreven volgens het protocol van R-Biopharm AG voor de Competitive ELISA-test.

De RIDA Quick Gliadin test is geschikt om snel te bepalen of er op de oppervlakte gluten aanwezig zijn. Met deze test kan dus snel bepaald worden of het oppervlak waarmee je wil werken glutenvrij is en dat er dus geen kruisbesmetting plaats kan vinden.

## 11.1 Competitive ELISA test

Verantwoording van dit werkplan is te vinden in het protocol dat verkregen is vanuit Huijbregts. <https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2016/10/R7021-Gliadin-competitive-16-09-21.pdf>

### 11.1.1 Benodigdheden

Er zijn meerdere stoffen en gereedschappen nodig om dit experiment uit te kunnen voeren. Hieronder zijn de benodigdheden opgesomd;

#### 11.1.1.1 Instrumenten

* Microtiter plaat spectrofotometer 450 nm
* Schudder (Vortex)
* Laboratoriummolen/ molen, stamper en vijzel, homogenisator
* Maatpipetten

Variërend tussen 20 µL -200µL en 200µL - 1000µL

* Fotometer
* Microwells
* Eppendorven

Plasticbuisjes waarin de monsters worden bewaard.

#### 11.1.1.2 Stoffen

* Gliadine behoudende producten
* Gedestilleerd water
* Substraat/chromogen

Dit is een enzym wat ervoor zorgt dat de oplossing fluoriserend kleurt wanneer er weinig allergenen aanwezig zijn.

* Enzymconjugaat

Dit is een enzym waaraan gliadine antistoffen zijn gebonden. Het enzymconjugaat kan dus binnen aan de gliadine-moleculen.

* Stopoplossing

Deze oplossing zorgt ervoor dat de reactie stopt. Wanneer de reactie is gestopt kan de absorptie worden gemeten.

* Wasbuffer (5fold)

De wasbuffer zorgt ervoor dat de niet gebonden antistoffen worden verwijderd.

* Buffer

De buffer zorgt ervoor dat de pH constant blijft.

### 11.1.2 Voorbereiding experiment

Voordat de ELISA-test uitgevoerd kan worden, moet er eerst voorbereidende stappen worden uitgevoerd.

1. Het reagens moet op kamertemperatuur worden gebracht.
2. Het geconcentreerde enzymconjugaat wordt verdund met gedestilleerd water. Dit gebeurt in de verhouding 1 : 10.
3. Het verdunde conjugaat wordt gepipetteerd. Deze verdunning mag niet met gliadine in aanraking zijn geweest.
4. De wasbuffer moet verwarmd worden tot 37 °C.
5. De verwarmde buffer moet vervolgens worden verdund met gedestilleerd water in een verhouding van 1 : 10.

De verdunde wasbuffer is voor 4 weken stabiel bij een temperatuur van 20-25 °C.

### 11.1.3 Uitvoering experiment

Wanneer de voorbereidende stappen goed zijn uitgevoerd, kan er begonnen worden aan de testprocedure.

1. Neem monsters af van het voorwerp. Hierdoor kan er onderzocht worden of het allergeen aanwezig is. Deze monsters worden afgenomen door een swab te nemen van de oppervlakte.
2. Er moeten voldoende putjes in de microwells aanwezig zijn. Leg vast wat de posities van bepaalde monsters zijn. Zorg er ook voor dat de microwells niet opdrogen.
3. Voeg 50 µL van het monster toe aan de gescheiden putjes.
4. Voeg 50 µL van het verdunde conjugaat toe. Mix handmatig de inhoud voorzichtig door de plaat een beetje te schudden of door de eppendorf op de vortex te plaatsen. Laat de inhoud voor 30 minuten even staan op kamertemperatuur.
5. Giet de vloeistof uit de putjes en zorg ervoor dat al het vloeistof op het absorberend papier komt door drie keer op de ‘microwells’ te tikken. Vul vervolgens alle putten met 250 µL wasbuffer en giet deze vloeistof weer uit de ‘microwells’. Herhaal dit twee keer.
6. Voeg 100 µL van de stopoplossing toe. Meng weer door voorzichtig te schudden. Meet vervolgens de absorptie bij een golflengte van 450 nm. Binnen tien minuten na de toevoeging van de stopoplossing moet de meting worden afgelezen.

### 11.1.4 Resultaten

Er is speciaal software om de resultaten te berekenen namelijk de RIDA SOFT Win/ RIDA SOFT Win.net (Art. Nr. Z9996), hiermee kan de enzymimmuunbepaling worden vastgesteld.

De berekeningen moeten worden uitgevoerd met een kubische spline functie. De standaard kromme is gegeven in Quality Assurance Certificate en die bevindt zich de kit van de test.

De gliadine-concentratie kan worden afgelezen van de standaard kromme en daarna moet deze uitkomst vermenigvuldigd worden met een verdunningsfactor van 500. Dit is standaard.

RIDA SOFT Win geeft de resultaten van de gluten- en gliadine-concentratie. Om dan van gliadine-concentratie naar gluten te gaan, moet de uitkomst met twee worden vermenigvuldigd. Maar dit is wel afhankelijk van het geanalyseerde monster. Gewassen zetmeel kan bijvoorbeeld meer gluteline bevatten en zal de factor groter zijn dan 2. De glutenconcentratie zal dan ook hoger zijn.

### 11.1.5 Verwerking

De gliadineconcentraties in de monsters worden bepaald via een kubische spline functie. Deze waardes worden vervolgens omgerekend naar µg/g of mg/kg voor de poedermonsters en µg/~100 cm2 voor de oppervlaktemonsters.

Om de bepalen of er gluten in de monsters zitten, worden de waardes vergeleken met de LOD en de LOQ.

LOD staat voor ‘limit of detection’. Het resultaat is positief wanneer de concentraties hoger zijn dan 2,3 µg/g, mg/kg of µg/~100 cm2. Het maakt verder niet uit in welke eenheid de concentraties staan, ze hebben namelijk dezelfde verhouding.

LOQ staat voor ‘limit of quantification’. Het resultaat is positief wanneer de concentraties hoger zijn dan de LOD, maar lager dan 5,0 µg/g, mg/kg of µg/~100 cm2. Wanneer de concentraties ook hoger zijn dan 5,0 µg/g, mg/kg of µg/~100 cm2, dan kan iemand met glutenintolerantie hier last van krijgen.

## 11.2 RIDA Quick Gliadin test

### 11.2.1 Benodigdheden

* Maatpipet
* Drie reageerbuisjes
* Buffer
* Test strips

### 11.2.2 Uitvoering experiment

1. Pipetteer 100 µL van de buffer en voeg die toe aan een reageerbuis. Doe dit voor drie reageerbuisjes.
2. Neem de monsters af door een swab te nemen van een oppervlakte met de test strips.
3. Voeg deze test strips toe aan de buffer in de reageerbuisjes.
4. Wacht 5 minuten.

# Resultaten en verwerking

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de testen benoemd en verder uitgewerkt.

## 12.1 Competitive ELISA

### 12.1.1 Algemeen

In Tabel 2 staan de monsters beschreven. Hier is aangegeven welk nummer het monster heeft en welke verdunning is toegepast.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Omschrijving | Gewicht (gram) | Verdunnen met (mL) |
| 1 | Begin | 0,1253 | 1,253 |
| 2 | Midden | 0,1290 | 1,290 |
| 3 | Eind | 0,1436 | 1,436 |
| 4 | Bloem | 0,1263 | 1,263 |
| 5 | Werk opp. (negatief) | Swab | 1,000 |
| 6 | Test (schep) | Swab | 1,000 |
| 7 | Besmet (positief) | Swab | 1,000 |

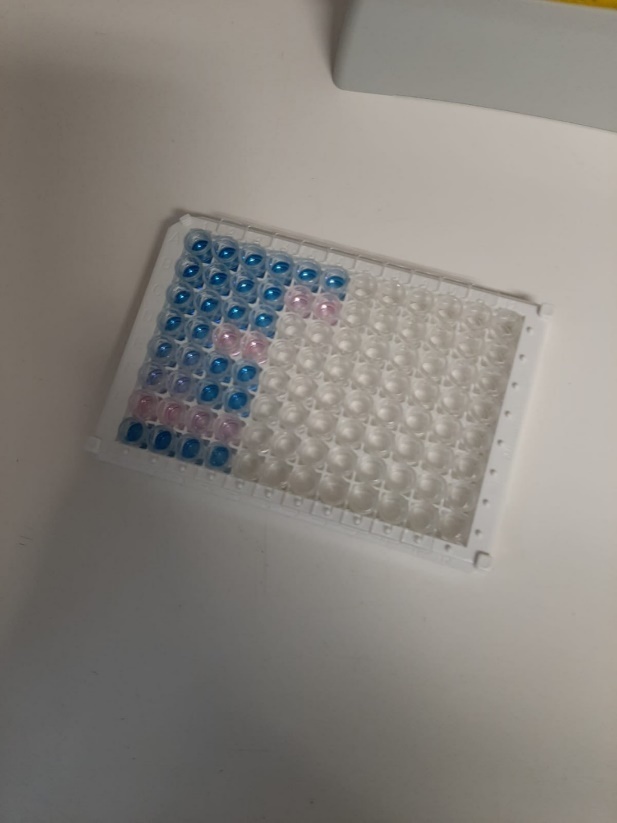
*Tabel 2.* Beschrijving monsters

In Tabel 3 is de indeling van de 96-plaat. De standaard 1 tot en met 5 zijn de richtlijnen die zijn inbegrepen met de test. De blank is de buffer die gebruikt is voor de verdunningen van de monsters. De positief en negatief geven aan of de test werkt en of het verdunnen goed is gebeurd zonder besmettingen.

De onderzoek monsters zijn 50 keer verdund. Deze monsters zijn aangegeven met één punt. Verder zijn de cijfers met twee puntjes een extra controle van de monsters met de swabs (5 tot en met 7). Deze monsters zijn 10 keer verdund i.p.v. 50 keer.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| A | Blank | Blank | 1. | 1. | 6.. | 6.. |
| B | Standaard 1 | Standaard 1 | 2. | 2. | 7.. | 7.. |
| C | Standaard 2 | Standaard 2 | 3. | 3. |  |  |
| D | Standaard 3 | Standaard 3 | 4. | 4. |  |  |
| E | Standaard 4 | Standaard 4 | 5. | 5. |  |  |
| F | Standaard 5 | Standaard 5 | 6. | 6. |  |  |
| G | Positief | Positief | 7. | 7. |  |  |
| H | Negatief | Negatief | 5.. | 5.. |  |  |

*Tabel 3.* Indeling 96-plaat

In Figuur 23 is te zien hoe de eindresultaten zichtbaar worden. De microwells die blauw zijn bevatten geen gluten. De reiniging van de machines is dus succesvol verlopen.

Figuur 23. Uitslag ELISA Competitieve

### 12.1.2 Absorptie

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | *Absorptie bij 450 nm* | | *Gemiddelde absorptie bij 450 nm* |
| *Standaard* | | | |
| 0 | 0,0615 | -0,0266 | 0,0175 |
| 10 | -0,3537 | -0,4197 | -0,3867 |
| 30 | -0,7595 | -0,8395 | -0,7995 |
| 90 | -1,3155 | -1,3688 | -1,3422 |
| 270 | -1,7225 | -1,7297 | -1,7261 |
| *Monsters poeder* | | | |
| Blank | 0,0325 | -0,0325 | 0,0000 |
| Positief | -2,2723 | -2,2675 | -2,2699 |
| Negatief | -0,3809 | -0,0721 | -0,2265 |
| 1. Begin | -0,35 | -0,327 | -0,3385 |
| 2. Midden | -0,4509 | -0,3677 | -0,4093 |
| 3. Eind | -0,3678 | -0,4328 | -0,4003 |
| 4. Bloem | -2,311 | -2,3164 | -2,3137 |
| *Monsters oppervlakte* | | | |
| 5. Negatief | -0,3247 | -0,4578 | -0,3913 |
| 6. Schep | -0,283 | -0,2302 | -0,2566 |
| 7. Positief | -2,164 | -2,158 | -2,1610 |
| 5.. | -0,5834 | -0,6018 | -0,5926 |
| 6.. | -0,4189 | -0,5377 | -0,4783 |
| 7.. | -2,2701 | -2,2886 | -2,2794 |

Om de concentratie gliadine te bepalen, is de absorptie gemeten. De absorptie is 10 minuten na het toevoegen van de stopoplossing gemeten bij een golflengte van 450 nm. De metingen staan hieronder in Tabel 4 weergegeven.

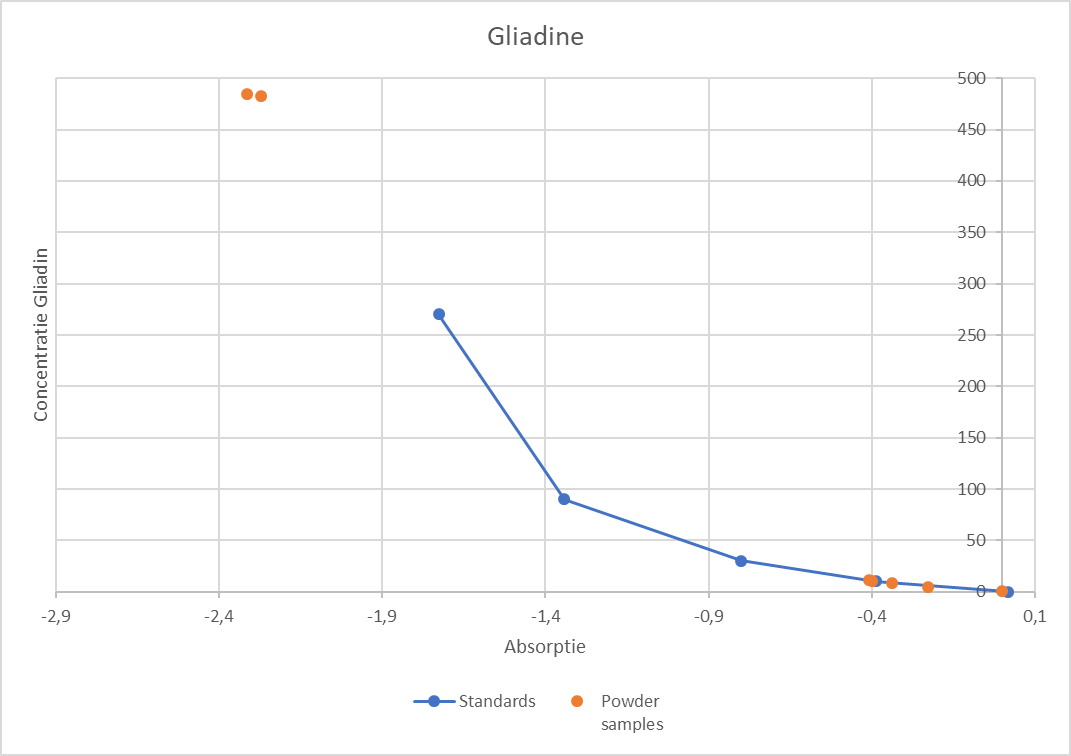
*Tabel 4.* Absorptie resultaten

De blank is nul omdat dit de buffer is, de buffer is voor het constant houden van de pH en de buffer heeft ook gediend als verdunningsmiddel. De blank heeft de hoogste absorptie, omdat hier geen bindingen plaats hebben kunnen vinden. De andere data is negatief, hier hebben namelijk wel bindingen plaats kunnen vinden.

Er zijn negatieve en positieve testmonsters gebruikt ter controle of de test goed werkt. Deze data kan ook vergeleken worden met de onderzoekmonsters. De positieve en negatieve poedermonsters waren voor de onderzoeksdag al voorbereid. De positieve en negatieve oppervlaktemonsters waren vlak voor het onderzoek voorbereid. Het negatieve monster was gemaakt van een schoon werkoppervlakte. Het positieve monster was gemaakt van een oppervlakte dat besmet is door tarwebloem.

Je kan wel duidelijk zien waar veel bindingen plaats hebben kunnen vinden en waar niet. Het positieve poeder testmonster heeft een absorptie van -2,2699. Hier is minder geabsorbeerd doordat er meer bindingen zijn gevormd. Het negatieve poedermonster heeft een absorptie van -0,2265. Hier is dus meer geabsorbeerd doordat er minder bindingen zijn gevormd. De data van de oppervlakte testmonsters komt hier ook mee overeen.

### 12.1.3 Bepaling concentraties

De concentraties van de monsters zijn bepaald via een ‘kubische spline functie’. Dit is gedaan met het bestand Excel. Deze bepaling heeft begeleidster Judit András uitgevoerd. Hierover wordt verder geen toelichting gegeven.

*Grafiek 1.* Vergelijking van de standaarden en de resultaten

Er zijn twee metingen die buiten het gebied van de standaarden vallen. Deze gliadine-concentraties zijn te hoog om de juiste waardes waar te nemen. Deze waardes zijn van de bloem en het positieve testmonster en je ziet in Grafiek 1 ook dat deze metingen positief zijn voor gluten.

### 12.1.4 Monsters poeder

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| *Monsters poeder* | *Concentratie verdunde monsters (50x)* | *Concentratie*  *Onverdunde monsters* | *W/W%gliadin  in het product* | | *Resultaat* |
|  | ***ng/mL*** | ***ng/mL*** | ***ng/g*** | ***µg/g or mg/kg*** | ***LOD/LOQ*** |
| Blank | 0,3 | 14 | 138 | 0,1 | **Negatief** |
| Positief | 482,5 | 24126 | 241258 | 241,3 | **Positief** |
| Negatief | 4,7 | 233 | 2329 | 2,3 | **Positief** |
| 1. Begin | 8,1 | 405 | 4049 | 4,0 | **Positief** |
| 2. Midden | 11,0 | 550 | 5497 | 5,5 | **5,5** |
| 3. Eind | 10,6 | 530 | 5295 | 5,3 | **5,3** |
| 4. Bloem | 484,3 | 24216 | 242157 | 242,2 | **Positief** |

In Tabel 5 zijn de concentraties en de resultaten van de poedermonsters weergegeven. De concentratie is bepaald met een kubische spline functie. Deze functie staat weergegeven in Grafiek 1.

*Tabel 5.* Concentraties en resultaten poedermonsters

In de eerste kolom staan de concentraties gliadine weergegeven, maar dit zijn nog de verdunde waardes. De concentratie moet dus vermenigvuldigd worden met vijftig, omdat dit de factor is waarmee de monsters verdund zijn.

De monsters zijn voorbereid 10 weight/volume%. Dit houdt in dat de concentratie in een verhouding 1 (g/mL) : 10 (g). De concentratie moeten dus gedeeld worden door 0,1. Hierdoor krijg je een concentratie van ng/g, oftewel W/W%. W/W% staat voor Weight/Weight%, dit is een gewicht concentratie. Bijvoorbeeld, in het positieve testmonster zit 241258 ng per gram poeder.

Volgens het protocol moeten de resultaten weergegeven worden in µg/g of mg/kg. Welke je kiest maakt niet uit, want de verhouding is hetzelfde tussen deze twee eenheden. Om deze concentratie te berekenen, moeten de waarden van ng/g gedeeld worden door 1000.

De resultaten worden bepaald door de ‘limit of detection’ (LOD) en de ‘limit of quantification’ (LOQ). Hoe deze bepaling werken staat uitgelegd in paragraaf 11.1.5.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| *Monsters oppervlakte* | *Concentratie verdunde monsters* | *Concentratie*  *Onverdunde monsters* | | *Resultaat* |
|  | ***ng/mL*** | ***ng/~100 cm2*** | ***µg/~100 cm2*** | ***LOD/LOQ*** |
| 5. Negatief | 10,2 | 510 | 0,5 | **Negatief** |
| 6. Schep | 5,5 | 273 | 0,3 | **Negatief** |
| 7. Positief | 464,3 | 23217 | 23,2 | **Positief** |
| 5.. | 20,5 | 205 | 0,2 | **Negatief** |
| 6.. | 14,4 | 144 | 0,1 | **Negatief** |
| 7.. | 483,2 | 4832 | 4,8 | **Positief** |

### 12.1.5 Monsters oppervlakte

In Tabel 6 zijn de concentraties en de resultaten van de oppervlaktemonsters weergegeven. De concentratie is bepaald met een kubische spline functie. Deze functie staat weergegeven in Grafiek 1.

*Tabel 6.* Concentraties en resultaten oppervlaktemonsters

In de eerste kolom staan de concentraties gliadine weergegeven, maar dit zijn nog de verdunde waardes. De concentratie moet dus vermenigvuldigd worden met vijftig, omdat dit de factor is waarmee de monsters verdund zijn. De monsters met twee puntjes zijn tien keer i.p.v. vijftig keer verdund. Na de vermenigvuldiging hebben de concentraties de eenheid ng/~100 cm2. Dit is omdat de swabs zijn genomen van een oppervlakte van 100 cm2

De monsters zijn op twee manieren verdund, dit is om te controleren of de verdunning invloed had op de bepaling van de concentraties. De verdunning met ethanol zou geen invloed moeten hebben op de concentraties, maar dit is niet meer zeker te zeggen. Er is een duidelijk verschil tussen de waardes met één punt en de waardes met twee puntjes. Dit is dus een discussiepunt van het onderzoek.

Volgens het protocol moeten de resultaten weergegeven worden in µg/~100 cm2. Om deze concentratie te berekenen, moeten de waarden van ng/~100 cm2 gedeeld worden door 1000.

De resultaten worden bepaald door de ‘limit of detection’ (LOD) en de ‘limit of quantification’ (LOQ). Hoe deze bepaling werken staat uitgelegd in paragraaf 11.1.5.

## 12.2 RIDA Quick Gliadin

Bij de RIDA Quick Gliadin test zijn er drie oppervlakten getest:

* Schoon oppervlakte (1)
* Test oppervlakte (schep) (2)
* Besmet oppervlakte (met bloem) (3)

Er zijn swabs genomen van deze drie oppervlakten en deze swabs zijn vervolgens aan de buffer toegevoegd. De resultaten van de test zijn te zien in Figuur 24.



1 2 3

Figuur 24. Uitslag RIDA Quick Glaidin

In Figuur 24 is dus te zien dat de controleeroppervlakten kloppen. De schone oppervlakte is negatief en de besmette oppervlakte is positief, dit is te zien aan de rode lijn. De test oppervlakte heeft geen rode streep, dit betekent dat er geen gluten op de schep aanwezig waren.

# Advies

Uit de resultaten is gebleken dat er geen gluten in de monsters van de poeders aanwezig waren. Verder is er ook aangetoond met de positief en negatief monsters dat de testen goed werken.

Hieruit kan er geconcludeerd worden dat de schoonmaakmethodes van Huijbregts voldoende zijn. Er zitten namelijk geen gluten in het product en heeft er dus geen kruisbesmetting met eerdere poedermixen plaatsgevonden De klanten van Huijbregts kunnen dus vertrouwen op de kwaliteit en zorgvuldigheid van het bedrijf.

Het advies wat uiteindelijk gegeven kan worden, is dat het zo goed gaat en dat er op deze manier doorgegaan kan worden.

Er zijn wel enkele discussiepunten over dit onderzoek. Deze staan beschreven in hoofdstuk 14 ‘Discussie’.

# Discussie

Tijdens de ELISA test bij Huijbregts zijn er een aantal stappen mogelijk niet nauwkeurig uitgevoerd. Hierdoor is de concentratie gluten in de monsters niet gelijk aan nul. Dit kan komen door onvoorzichtigheid tijdens het pipetteren. Bij de laatste stap van de test moeten de monsters in de microwells gepipetteerd worden. Het kan zijn de wanden van de microwells zijn aangeraakt met het pipet. Hierdoor komt er gliadine in de monsters en lijkt het dus besmet.

Overigens is wel aan te tonen dat deze concentratie zo laag is, onder de LOD, dat de gliadine niet tot een reactie zal leiden in het lichaam. Dit wil zeggen dat er ergens dus een minimale besmetting heeft plaats gevonden.

# Nawoord

Allereerst willen we zeggen dat we erg tevreden zijn met onze meesterproef. Het is een verslag geworden met diepgang en met gebruik van goede en betrouwbare bronnen. Wij hebben hier hard aan gewerkt en van uit allerlei kanten hulp gevraagd over de stof. Dit was vooral het geval bij het onderzoek naar de specifieke allergenen en bij het maken van het werkplan.

Tijdens het werken aan deze meesterproef hebben we geleerd om toch door te gaan wanneer we vastlopen en om bij het begin te beginnen als de stof op het eerste gezicht lastig lijkt te zijn. Gelukkig hadden we wel de goede mensen om ons heen die af en toe wel toelichting konden geven.

Verder zijn we erachter gekomen hoe we de goede en betrouwbare bronnen kunnen vinden en ook kunnen gebruiken. Tijdens het literatuuronderzoek hebben we verschillende bronnen langs elkaar bekeken en de overeenkomsten kort voor ons zelf samengevat. Hieruit konden we de lastige stof voor ons zelf duidelijk maken en het op een manier opschrijven dat het ook voor anderen te begrijpen is.

Als laatst hebben we geleerd om zelfstandig te werken. De opdrachtgever had niet altijd genoeg tijd om door ons verslag te bladeren. Onze vragen hebben we voor het grootste deel zelf uitgezocht door er samen naar te kijken.

# Literatuurlijst

AAT Bioquest (2020) What is a direct ELISA?

Geraadpleegd van: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-a-Direct-ELISA>

Abcam (z.d.) Types of ELISA

Geraadpleegd van: <https://www.abcam.com/kits/types-of-elisa>

Allergenen consultancy (2017) Wat zijn allergenen?

Geraadpleegd van: <https://www.allergenenconsultancy.nl/allergenenlijst>

Bergkamp, B. (2011) Allergische reacties op celniveau.

Geraadpleegd van: <https://wetenschap.infonu.nl/anatomie/75331-allergische-reactie-op-celniveau.html>

Biologiepagina [foto/video] (z.d.) Afweer

Geraadpleegd van: <https://biologiepagina.nl/Videobiologie/BBafweerAllergie.htm>

Broeck, Gilissen (2015) Tarwe en voedselovergevoeligheid

Geraadpleegd van: <https://www.researchgate.net/profile/Fred_Brouns/publication/326998134_Broeck_Gilissen_Brouns_2015-_Tarwe_Voedselovergevoeligheid-Stand_van_wetenschap_en_oplossingsrichtingen_voor_de_bakkerijsector/links/5b71e2a1a6fdcc87df7448cb/Broeck-Gilissen-Brouns-2015-Tarwe-Voedselovergevoeligheid-Stand-van-wetenschap-en-oplossingsrichtingen-voor-de-bakkerijsector.pdf>

Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Knulst, A.C., & de Monchy, J.G.R. (2008) Handboek allergologie

Geraadpleegd van: <https://www.tijdstroom.nl/media/1/inkijkex_hb_allergologie.pdf>

Cornelis G. de Kruif, Thom Huppertz, Volker S. Urban, Andrei V. Petukhov (20 januari 2012) Advances in Colloid and Interface Science

Geraadpleegd van: <https://www.uu.nl/sites/default/files/casein_micelles_and_their_internal_structure.pdf>

Darmgezond (z.d.) Coeliakie

Geraadpleegd van: <https://www.darmgezondheid.nl/darmklachten/darmaandoeningen/coeliakie/>

Darmgezond [foto] (z.d.) Coeliakie

Geraadpleegd van: <https://www.darmgezondheid.nl/darmklachten/darmaandoeningen/coeliakie/>

De Busser, A., Van Meerbeeck, K. & Gillis, K. (2017) Wat is een voedselintolerantie?

Geraadpleegd van: <https://www.allergiedietisten.com/wat-een-voedselintolerantie/>

Dessal (2019) Mestcel activatie syndroom: extreme allergische reacties

Geraadpleegd van: <https://mens-en-gezondheid.infonu.nl/aandoeningen/186504-mestcel-activatie-syndroom-extreme-allergische-reacties.html>

Katholieke universiteit Leuven (2019) caseïne en kabbelen.

Geraadpleegd van: <https://wet.kuleuven.be/wetenschapinbreedbeeld/lesmateriaal_biochemie/zure_melk/caseine>

Kees de Kruif (2009) Melkeiwit, meesterlijk en functioneel

Geraadpleegd van: <https://www.genootschapmelkkunde.nl/symposia/verslagen/101-melkeiwit-meesterlijk-en-functioneel>

Maagdarmleverstichting

Geraadpleegd van: <https://www.mlds.nl/het-ontstaan-van-de-bewakers-van-de-darmwand-ontdekt/>

Maxima medisch centrum (2019) Vormen van allergische reacties

Geraadpleegd van: <https://www.mmc.nl/allergologie/allergologie/vormen-allergische-reacties/>

Medisch centrum voor huisartsen [foto] (z.d.) Allergie

Geraadpleegd van: <https://www.medischcentrumhuisartsen.be/documents/labo/pdf/wet--info/chemie/mch-allergie-feb-2015-lvc.pdf>

Nederlands Anafylaxis Netwerk (2019) Ontstaan van allergische aandoeningen

Geraadpleegd van: <https://www.anafylaxis.nl/allergie/wat-is-allergie-of-anafylaxie/ontstaan-van-allergie-anafylaxie/>

Nederlands Anafylaxis Netwerk (2019) Voedselallergenen: wat zijn dat?

Geraadpleegd van: <https://www.anafylaxis.nl/stoffen-die-anafylaxie-kunnen-uitlokken/voedsel-allergenen-wat-zijn-dat/melk/>

Nederlands Anafylaxis Netwerk (2019) Wat is allergie?

Geraadpleegd van: <https://www.anafylaxis.nl/allergie/allergie/>

Nederlands Anafylaxis Netwerk [foto] (2019) Wat is allergie?

Geraadpleegd van: <https://www.anafylaxis.nl/allergie/allergie/>

Nejm [foto] (z.d.) IgE-antistof

Geraadpleegd van: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1414850>

Organisatie Milk and Health (2017) Eiwitten kunnen slecht tegen hitte  
Geraadpleegd van: <https://www.milkandhealth.com/2017/09/20/eiwitten-kunnen-slecht-tegen-hitte/>

P. Kelly, G.W. Smithers (2009) Beta-Lactoglobulin

Geraadpleegd van: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/beta-lactoglobulin>

R-biopharm (z.d.) ELISA

Geraadpleegd van: <https://food.r-biopharm.com/nl/technologieen/elisa/>

Rudy Mawer (16 september 2016) Why Casein Is One of The Best Proteins You Can Take.

Geraadpleegd van: <https://www.healthline.com/nutrition/casein-protein-is-highly-underrated#section2>

Sainte-Justine Hospital Research Centre (3 juni 2012) Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology

Geraadpleegd van: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22660791>

Sino biological (z.d.) Competitive ELISA

Geraadpleegd van: <https://www.sinobiological.com/competitive-elisa.html>

Sino Biological [foto](z.d.) Competitive ELISA

Geraadpleegd van: <https://www.sinobiological.com/competitive-elisa.html>

Sino Biological (z.d.) Indirect ELISA

Geraadpleegd van: <https://www.sinobiological.com/indirect-elisa.html>

Sino Biological [foto] (z.d.) Indirect ELISA

Geraadpleegd van: <https://www.sinobiological.com/indirect-elisa.html>

Sino Biological (z.d.) Sandwich ELISA

Geraadpleegd van: <https://www.sinobiological.com/sandwich-elisa.html>

Sino Biological [foto] (z.d.) Sandwich ELISA

Geraadpleegd van: <https://www.sinobiological.com/sandwich-elisa.html>

Stichting voedselallergie (z.d.) Wat is koemelkallergie?

Geraadpleegd van: <https://www.voedselallergie.nl/allergenen/melk.html>

UniProt [foto] UniProtKB - P02754 (LACB\_BOVIN)

Geraadpleegd van: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02754>

Van de Merwe, J.P. (19 juni 2018) Coeliakie, glutensensitiviteit en tarwe-allergie

Geraadpleegd van: <http://www.van-de-merwe.eu/Sjogren/NL/coeliakie_v03.pdf>

Van de Merwe, J.P. [tabel] (19 juni 2018) Coeliakie, glutensensitiviteit en tarwe-allergie

Geraadpleegd van: <http://www.van-de-merwe.eu/Sjogren/NL/coeliakie_v03.pdf>

Van der Velden, J. (2014) Caseïne allergie – symptomen, achtergrond en advies

Geraadpleegd van: <https://jessevandervelde.com/caseine-allergie-symptomen-achtergrond-en-advies/>

Vondermans, C. (2016) Voedselallergie versus voedselintolerantie

Geraadpleegd van: <https://www.gezondheidsnet.nl/allergie/voedselallergie-versus-voedselintolerantie>

Weegels, P.L. (1994) Gluten

Geraadpleegd van: <https://www.yumpu.com/nl/document/read/19845818/gluten-chemische-feitelijkheden>

1. De figuren 6 tot en met 10 zijn screenshots uit de video op biologiepagina <https://biologiepagina.nl/Videobiologie/BBafweerAllergie.htm> [↑](#footnote-ref-1)