

Određivanje alergena kikirikija u uzorcima sladoleda imunoenzimskom metodom

Vidaković, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:040844>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Helena Vidaković

899/PI

**ODREĐIVANJE ALERGENA
KIKIRIKIJA U UZORCIMA
SLADOLEDA
IMUNOENZIMSKOM METODOM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Ksenije Marković, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA SLADOLEDA IMUNOENZIMSKOM METODOM

Helena Vidaković, 899/PI

Sažetak: Tijekom ovog istraživanja određeni su potencijalni alergeni kikirikija u trideset i devet uzoraka sladoleda prikupljenih u slastičarnicama i trgovačkim lancima pomoću ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metode te su prikupljeni stavovi i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Alergeni kikirikija detektirani su u petnaest od ukupno devetnaest uzoraka sladoleda iz slastičarnica, a udio se kretao u rasponu od 0,15 mg kg⁻¹ do 12,22 mg kg⁻¹. Između dvadeset analiziranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca, alergeni kikirikija detektirani su kod njih dvanaest, a udio je iznosio od 0,20 mg kg⁻¹ do 5,44 mg kg⁻¹. Rezultati određivanja alergena kikirikija imunoenzimskom ELISA metodom uspoređeni su također sa informacijama o hrani analiziranih uzoraka, a vezanim uz prisutnost alergena kikirikija, te se podudaraju u četiri slučaja od devetnaest nepretpakiranih uzoraka sladoleda iz slastičarnica i dvanaest od dvadeset zapakiranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca. Većina ispitanika (84,4 %) smatra da sladoled može sadržavati tragove kikirikija ukoliko kikiriki nije jedan od sastojaka sladoleda, a obzirom na dodatne navode o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija, 40,1 % ispitanika smatra da proizvod kao što je sladoled ne sadrži tragove kikirikija ukoliko na deklaraciji nema dodatnog navoda o njegovoj mogućoj prisutnosti.

Ključne riječi: alergeni, kikiriki, sladoled, ELISA metoda

Rad sadrži: 52 stranice, 20 slika, 4 tablice, 105 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Ksenija Marković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. Nada Vahčić
2. prof.dr.sc. Ksenija Marković
3. prof.dr.sc. Ines Panjkota Krbavčić
4. doc.dr.sc. Irena Barukčić (zamjena)

Datum obrane: 25. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF PEANUT ALLERGENS IN SAMPLES OF ICE CREAM BY IMMUNOENZYMATIC METHOD

Helena Vidaković, 899/PI

Abstract: During this research, potential peanut allergens were detected in thirty-nine ice cream samples collected from pastry shops and supermarkets using the ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) method, and the views and opinions of consumers about peanuts and peanut products as substances or products that cause allergies was examined. Peanut allergens were detected in fifteen of nineteen ice cream samples, and the content ranged from 0.15 mg kg⁻¹ to 12.22 mg kg⁻¹. Between twenty analysed ice cream samples, in twelve peanut allergens were detected, and the content was between 0.20 mg kg⁻¹ to 5.44 mg kg⁻¹. The results of peanut allergen determination by the immunoenzymatic ELISA method were also compared with the food information of the analysed samples, related to the presence of peanut allergens, and matched in four cases of nineteen non-prepacked ice cream samples from pastry shops and twelve out of twenty packed ice cream samples from supermarkets. Most respondents (84.4%) thought that ice cream could contain traces of peanuts if peanuts were not one of the ingredients of ice cream, and given the additional allegations of possible presence of peanut allergens, 40.1% of respondents thought that a product such as ice cream did not contain traces of peanuts if there is no additional indication of its possible presence on the declaration.

Keywords: allergens, peanut, ice cream, ELISA method

Thesis contains: 52 pages, 20 figures, 4 tables, 105 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD Ksenija Marković, Full professor

Reviewers:

1. PhD. Nada Vahčić, Full professor
2. PhD. Ksenija Marković, Full professor
3. PhD. Ines Panjkota Krbavčić, Full professor
4. PhD. Irena Barukčić, Assistant professor

Thesis defended: 25 September 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ALERGIJA NA HRANU	2
2.1.1. Mehanizmi alergijskih reakcija	2
2.2. KIKIRIKI KAO NUTRITIVNI ALERGEN.....	3
2.2.1. Općenito o kikirikiju.....	3
2.2.2. Alergeni kikirikija	4
2.2.3. Alergijska reakcija na kikiriki	5
2.3. Metode određivanja alergena kikirikija	9
2.3.1. Imunoanalitičke metode.....	9
2.3.2. Molekularno-genetske metode	10
2.4. ELISA metoda u određivanju nutritivnih alergena	11
2.4.1. Općenito o ELISA metodi.....	11
2.4.2. ELISA testovi.....	11
2.5. OZNAČAVANJE ALERGENA.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Uzorci	15
3.1.2. Laboratorijska oprema i pribor.....	15
3.1.3. Reagensi.....	17
3.1.4. Ispitanici.....	18
3.2. METODE RADA.....	18
3.2.1. Priprema reakcijskih otopina.....	18
3.2.2. Ekstrakcija uzoraka.....	18
3.2.3. Analiza uzoraka ELISA testom	18
3.2.3.1. Princip određivanja	18
3.2.3.2. Postupak određivanja	19
3.2.4. Upitnik o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije.....	21
3.2.5. Obrada rezultata	21
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
4.1. UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA SLADOLEDA	22
4.2. STAVOVI I MIŠLJENJA POTROŠAČA O KIKIRIKIJU I PROIZVODIMA OD KIKIRIKIJA KAO TVARIMA ILI PROIZVODIMA KOJI UZROKUJU ALERGIJE	28
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	43

1.UVOD

Alergija na hranu predstavlja rastući problem u razvijenim zemljama, te posljednjih nekoliko desetljeća predstavlja veliki izazov za medicinu i prehrambenu industriju (Besler, 2001). Smatra se kako učestalost alergije na hranu iznosi 3-5 % kod odraslih osoba i oko 8 % kod djece širom svijeta (Gupta i sur., 2011; Sicherer, 2011). Osjetljivi potrošači moraju se oslanjati na izbjegavanje hrane koja izaziva alergiju kako bi spriječili alergijske reakcije. Uspješno izbjegavanje ovisi o potpunim i točnim informacijama o sastojcima hrane te informacijama u okviru savjetodavnih oznaka (Gendel, 2012). Skriveni alergeni mogu se nalaziti u hrani iz različitih razloga (Taylor i Hefle, 2001).

Kikiriki (*Arachis Hypogea*) je jedan od 14 glavnih alergena koji moraju biti označeni ukoliko su sastojci zapakirane ili nepretpakirane hrane, prema Uredbi (EU) br.1169/2011 (Zagon i sur., 2015). Jedna je od najčešćih alergeni namirnica s rasprostranjenošću u svijetu od 0,6 do 2,9 % (Osborne i sur., 2011), a karakterizira je jaka alergenost (Petersen i sur., 2013).

Najčešća metoda koja se koristi u prehrambenoj industriji za detekciju alergena kikirikija je imunoenzimska ELISA (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metoda (Holzhauser i sur., 1999).

Cilj ovog rada bit će imunoenzimskom ELISA metodom odrediti udio potencijalnih alergena kikirikija u devetnaest nepretpakiranih uzoraka sladoleda iz slastičarnica te dvadeset zapakiranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca te usporediti dobivene analitičke rezultate sa informacijama o hrani, vezanim uz prisutnost alergena kikirikija, analiziranih nepretpakiranih i zapakiranih uzoraka, kao i prikupiti stavove i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALERGIJA NA HRANU

Alergija na hranu može se definirati kao neželjena, imunološki posredovana reakcija na hranu koja se pojavljuje kod nekih pojedinaca (Taylor, 2006), odnosno alergija na hranu je neželjeni imunološki odgovor na hranu ili komponente hrane. Alergeni u hrani najčešće predstavljaju proteine ili glikoproteine molekulske mase od 10 do 70 kDa (Bush i Hefle, 1996). Alergija na hranu vrlo često označava imunološki mehanizam zastupljen IgE posredovanim reakcijama (Bruijnzeel-Koomen, 1995). Ukupna rasprostranjenost nutritivnih alergija posredovanih IgE u SAD-u obuhvaća 3-4 % stanovništva. Učestalost je najveća u dojenčadi i kod male djece te iznosi 4-8 % (Sampson, 1990). U Velikoj Britaniji učestalost iznosi 8 % kod djece mlađe od tri godine i 1-2 % kod odraslih (Sampson, 1999). Kravlje mlijeko, jaja i kikiriki su najčešći alergeni kod male djece dok su školjke, riba i kikiriki najčešći alergeni kod odraslih ljudi (Sampson i McCaskill, 1985). U Velikoj Britaniji provedeno je istraživanje 16 434 odraslih osoba gdje je učestalost prijavljenih alergija na mlijeko 0,71 %, jaja 0,68 %, voće 0,54 %, orašaste plodove 0,40 % te kikiriki 0,39 % (Emmet, 1999). Sklonost alergiji na hranu ovisi o dobi, lokalnoj prehrani i mnogim drugim čimbenicima (Sicherer, 2007). Najčešće namirnice koje sadrže alergene sastojke mogu se podijeliti u osam skupina: mlijeko, jaja, ribe, rakovi, kikiriki, soja, orašasti plodovi i pšenica (Bousquet i sur., 1998).

2.1.1. Mehanizmi alergijskih reakcija

Obzirom na prirodu imunološkog odgovora, nutritivne alergije mogu uključivati neposredne reakcije preosjetljivosti i reakcije usporene preosjetljivosti (Lemke i Taylor, 1994), odnosno često govorimo o IgE posredovanim reakcijama i ne-IgE posredovanim reakcijama (usporena preosjetljivost). IgE posredovana reakcija može se još nazivati neposredna preosjetljivost ili alergija tipa I. Pojedine osobe imaju predispoziciju za razvoj specifičnih IgE antitijela koja prepoznaju alergene iz okoliša (Taylor, 2001). Kod IgE posredovanih reakcija simptomi se pojavljuju u roku od nekoliko minuta do sat vremena nakon gutanja hrane. Simptomi su obično vezani uz kožu, probavni i dišni sustav. Simptomi kože najčešće uključuju akutnu urtikariju, angioedem ili pruritični eritemski osip na koži, probavni akutno povraćanje, bol u truhu i dijareju, a oni gornjeg i donjeg dišnog sustava laringealni edem, kašalj, promjenu glasa i promuklost. Anafilaksija može uključivati sve ove simptome i sustave, a dodatno se mogu pojaviti srčanožilni simptomi kao hipotenzija i disritmija (Bock i sur., 2001; Sampson i sur., 1992).

Simptomi reakcija usporene preosjetljivosti javljaju se tek 6-24 sati nakon gutanja hrane (Taylor i Hefle, 2001). Te se reakcije razvijaju sporo i doživljavaju vrhunac 48 sati nakon gutanja hrane te opadaju nakon 72-96 sati. Mehanizam reakcija usporene preosjetljivosti uključuje interakciju određenih alergena iz hrane i T limfocita. Stimulacija limfocita uključuje stvaranje citokina i limfokina koji izazivaju lokalne upale (Sampson, 1991). Antitijela nisu uključena u ove reakcije, a određene mehanizme usporene preosjetljivosti uključuje i celijakija ili glutenska enteropatija (Strober, 1986).

2.2. KIKIRIKI KAO NUTRITIVNI ALERGEN

2.2.1. Općenito o kikirikiju

Kikiriki (lat. *Arachis hypogea L.*), poznat i kao arahid, arahis, zemno orašće, orašac, jednogodišnja je biljka porijeklom iz Meksika, Južne i Srednje Amerike. Početkom 18. stoljeća došla je u SAD koje su trenutno na 3. mjestu sa 6 % proizvodnje u svijetu. Na prva dva mjesta su uvjerljivo Kina (40 %) i Indija (25 %) (Car, 2017). Kikiriki je biljka koja pripada botaničkoj porodici *Leguminosae* (mahunarke) u koju se ubraja i grah, grašak, soja i leća. Kikiriki je biljka grmolikog oblika (poput djeteline) koja naraste od 30 do 50 cm u visinu. Cvjetovi biljke razvijaju se iznad zemlje, a zatim se zbog težine cvjetova cvjetne stapke savijaju i cvjetovi ulaze u zemlju gdje se razvijaju u mahune. Mahune kikirikija svijetlosmeđe su boje i sadrže 1 do 4 zrna ovalnog oblika, građena od dvije polovice (supke) prekrivene crveno-smeđom tankom kožicom (sjemena lupina). Kikirikiju odgovara sunčano i toplo područje s umjerenom količinom oborina. Za klijanje mu je potrebna temperatura od 21 °C. Ovisno o sorti kikirikija, razdoblje cvjetanja traje 30 do 40 dana, a od sjetve (obično u svibnju) do ubiranja plodova prođe od 4 do 5 mjeseci. Na jednoj biljci formira se 30 do 500 mahuna. U vrijeme berbe plodovi sadrže oko 50 % vlage pa je potrebno dodatno sušenje do 10 % vlage. Oljuštene, neobrađene sjemenke kikirikija sadrže oko 28 % proteina i 18 % ugljikohidrata, a s 567 kcal na 100 g odličan su izvor energije. Kikiriki je odličan izvor mononezasićenih masnih kiselina, vitamina B skupine, vitamina E, a uz nešto manje vitaminima A, C i D, sjemenke su bogate i magnezijem i vlaknima. Najpopularnije uzgojne sorte kikirikija su Spanish, Runner, Virginia i Valencia Certain. Razlikuju se obzirom na okus, sadržaj ulja, veličinu i oblik sjemena, pa se i koriste u različitim proizvodima (Car, 2017).

Usprkos popularnosti, uz kikiriki se vežu dva rizika sigurnosti; jedan od njih je kontaminacija aflatoksinom koji potiče od plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Aflatoksin može imati štetan utjecaj na zdravlje ljudi, međutim pravilno skladištenje i rukovanje može u

potpunosti ukloniti rizik od kontaminacije aflatoksinom. Drugi rizik za sigurnost predstavlja činjenica da je kikiriki jedan od najčešćih uzroka alergijskih reakcija kod osjetljivih pojedinaca (Wen i sur., 2007).

2.2.2. Alergeni kikirikija

Sjemenka kikirikija u prosjeku sadrži 29 % proteina (Freeman i sur., 1954). Otprilike 20 % proteina može se pripisati glavnom alergenu Ara h 1, a otprilike 10 % drugom alergenu Ara h 2 (Burks i sur., 1998; Koppelman i sur., 2001). Ara h 1 i Ara h 2 su prepoznati u 70-90 % ljudi s nutritivnom alergijom na kikiriki, dok je Ara h 3 prepoznat kod 44 do 54 % ljudi s nutritivnom alergijom na kikiriki (Kang i sur., 2007).

Ara h 1 je glikoprotein molekulske mase 63,5 kDa i izoelektrične točke (pI) 4,55. Provođenjem analize DNK sekvence utvrđeno je da Ara h 1 ima podudaranost sa skladišnim proteinom vicilinom. Ara h 1 stvara stabilnu trimernu strukturu koja se temelji na hidrofobnim interakcijama. Ara h 1 sadrži 23 linearna epitopa koji se vežu na IgE. Među njima epitopi 1, 3, 4 i 17 su imunodominantni i jedna promjena aminokiselina unutar peptida može imati drastične utjecaje na karakteristike vezanja za IgE (Wen i sur., 2007).

Ara h 1 je idealan biomarker za otkrivanje alergena kikirikija iz mnogih razloga (Pomès i sur., 2003). Ara h 1 je toplinski stabilan, odnosno zagrijavanjem izoliranog Ara h 1 iz kikirikija uočena su ista svojstva vezanja za IgE kao i u slučaju native molekule Ara h 1 (Koppelman i sur., 1999). Nije zabilježena križna kontaminacija između Ara h 1 i orašastih plodova te ostalih mahunarki koje pripadaju istoj botaničkoj skupini, što znači da neki proteini iz različitih mahunarki imaju zajedničke epitope (Pomès i sur., 2003).

Ara h 2 je glikoprotein molekulske mase 17 kDa i pI 5,2 (Wen i sur., 2007). Ara h 2 je monomerni protein koji sadrži 8 cisteinskih ostataka koji mogu formirati 4 disulfidne veze. Također ima podudarnost sa skladišnim proteinom konglulinom (Mikita i sur., 2012). Disulfidne veze pridonose stabilnosti Ara h 2. Djeluje kao slabi inhibitor tripsina te štiti Ara h 1 od djelovanja tripsina. Ara h 1 izoliran iz pečenog kikirikija je manje topljiv, dok u slučaju Ara h 2 pečenje manje utječe na topljivost. Oba alergena iz pečenog kikirikija se bolje vežu na IgE nego alergeni iz sirovog kikirikija. Toplinskom obradom povećava se stabilnost alergena Ara h 2, povećavaju se alergena svojstva i poboljšava inhibicija tripsina (Maleki i sur., 2003). Ara h 3 identificiran je kao treći alergen kikirikija s molekulskom masom od 57 kDa. Ara h 3 dijeli homologiju s ostalim proteinima iz porodice glicinina kao G1 i G2 glicinini te beta-koglicinin u sojinim alergenima, potencijalno doprinosi križnoj kontaminaciji između kikirikija i drugih mahunarki (Mikita i sur., 2012).

Ara h 4 je četvrti alergen molekulske mase 61 kDa i izoelektrične točke 5,2. Rekombinantni oblik Ara h 4 pronađen je u 53 % ljudi s nutritivnom alergijom na kikiriki. 91,3 % aminokiselina podudara se između Ara h 3 i Ara h 4 te se smatraju istim alergenima. Stoga kao i Ara h 3 pripada porodici glicinina (Wen i sur., 2007).

Ara h 5 je protein s 131 aminokiselinom, molekulske mase 14 kDa i izračunatim pI 4,6. Pripada porodici proteina profilina koji su aktin vezajući proteini. Vrlo je niska frekvencija osjetljivosti jer se profilin u malim količinama nalazi u sjemenkama kikirikija. Čest je alergen u križnim kontaminacijama sa peludom breze, trave i pšenice. Učestalost osjetljivosti na Ara h 5 iznosila je 13 % na 40 ispitanika (Wen i sur., 2007).

Kodirajuće područje Ara h 6 sadrži 375 nukleotida, 124 aminokiselina, molekulske mase 14,5 kDa i pI 5,2. Dok Ara h 7 ima 408 nukleotida, molekulske mase 15,8 kDa i pI 5,6. Oba alergena pokazuju sličnost sa sekvencijama aminokiselina iz porodice skladišnog proteina kolutina. Učestalost osjetljivosti na Ara h 6 i Ara h 7 na 40 ispitanika bila je 38 % i 43 %. Neka istraživanja pokazuju da se Ara h 6 može pronaći 120 minuta nakon probave pepsina i 40 minuta nakon zagrijavanja u prisutnosti šećera, pšeničnog brašna i maslaca (Suhr i sur., 2004).

Ara h 8 sadrži 157 aminokiselina, molekulske mase 16,9 kDa i pI 5,03. Pokazuje moguću križnu kontaminaciju s Bet v1 koji je glavni peludni alergen breze i javlja se u rano proljeće. Ova dva alergena dijele 45,9 % sličnosti u aminokiselinama i imaju sličnu sekundarnu strukturu. To rezultiralo time da peludna alergija može biti povezana s alergijom na kikiriki te primarna osjetljivost na pelud može biti jedan od razloga razvoja alergije na kikiriki (Wen i sur., 2007).

2.2.3. Alergijska reakcija na kikiriki

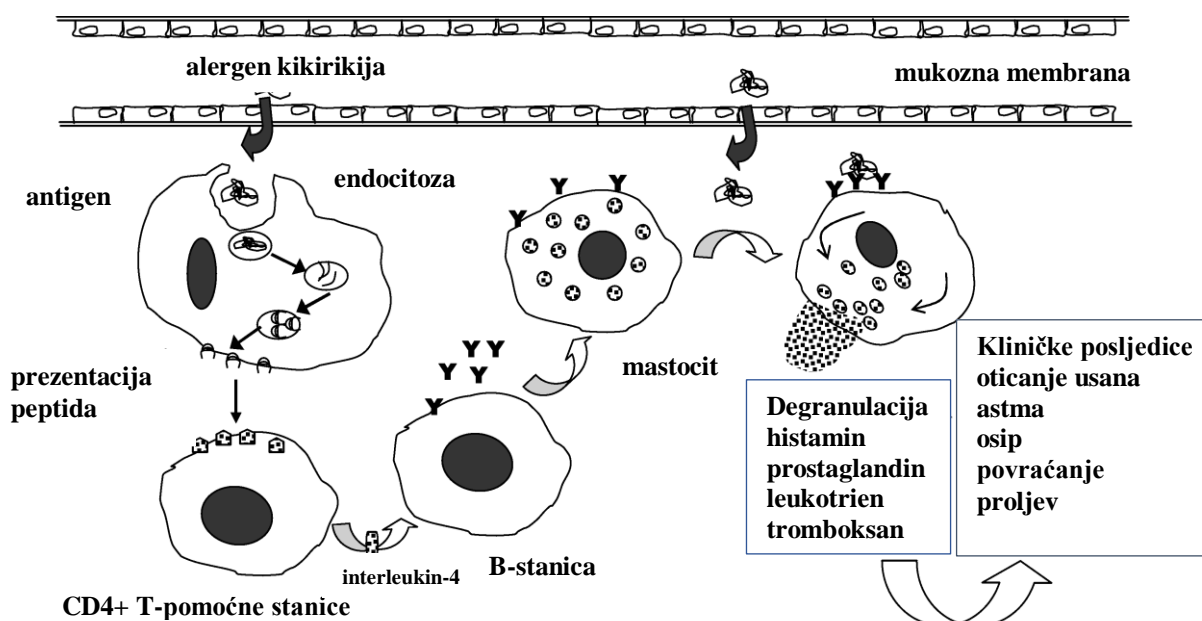
Alergija na kikirikija je tipična IgE posredovana imunološka reakcija. Klinički simptomi se pojavljuju u roku od nekoliko sekundi, pa i do 2 sata nakon unosa čak nekoliko miligrama kikirikija (Burks, 2008). To je treća najčešća alergija na hranu kod mlađe djece (Bock, 1987) i najčešća alergija na hranu kod starije djece, adolescenata i odraslih (Sicherer i sur., 1999). Hrana koja sadrži kikiriki popularna je širom svijeta, međutim često može izazvati čak i anafilaktički šok sa smrtnim posljedicama (Chen i sur., 2012). Smrti uzrokovane kikirikijem česte su u SAD-u i Kini (Ji i sur., 2009). Jedno istraživanje je pokazalo da je alergija na kikiriki utjecala na 0,8 % adolescenata i 0,6 % odraslih osoba u SAD-u (Sampson, 2004). U Francuskoj 1 % populacije pati od alergije na kikiriki. Učestalost alergije na kikiriki povećala se u prošlom desetljeću (Kanny i sur., 2001). Razlog tome je što vrlo mala količina kikirikija 0,1-1000 mg može izazvati alergijsku reakciju (Wensing i sur., 2002). Do 80 % pojedinaca alergičnih na

kikiriki reagira kroz reakcije senzibilizacije tijekom prvog izlaganja kikirikiju (Sicherer i sur., 1999). Početna dijagnoza često se temelji na povijesti bolesti nekolicine kliničkih reakcija u kombinaciji s povišenom razinom IgE antitijela u serumu ili pozitivnih testova kože. U manjem broju slučajeva koriste se dvostruko slijepi placebo testovi (Sampson, 2002). Za razliku od drugih dječjih alergija koje većinom izostanu u kasnijoj dječjoj dobi, alergija na kikiriki ima tendenciju trajanja i tijekom odrasle životne dobi (Hourihane, 1998). Međutim, više nedavnih istraživanja dokazalo je da alergija na kikiriki može izostati u kasnijoj dobi (Wen i sur., 2007). Istraživanje na 223 ispitanika pokazalo je da je kod 21,5 % alergija na kikiriki izostala u odrasloj dobi, osobito kod pojedinaca koji su imali nisku razinu IgE antitijela specifičnih za kikiriki u ranijoj dobi (Skolnick i sur., 2001). Štoviše, pojedinci s blažim reakcijama imali su bolju šansu za razvoj tolerancije od pojedinaca čiji su prvi simptomi bili anafilaktička reakcija (Spergel i Fielder, 2001). Godišnje u SAD-u 30 000 osoba traži hitnu liječničku pomoć zbog simptoma anafilaktičkog šoka (Sampson, 2000), a pri tome jedna trećina zbog posljedica izloženosti kikirikiju (Sampson i Ho 1997). Analize 32 smrtna slučaja zbog anafilaktičkog šoka, pokazale su kako ih je čak 90 % povezano s kikirikijem i orašastim plodovima (Bock i sur., 2001). U Velikoj Britaniji se od 1989. godine do 1995. godine broj trogodišnje djece s nutritivnom alergijom na kikiriki povećao sa 1,3 % na 3,2 % (Emmet i sur., 1999). Da bi se zaštitili pojedinci alergični na kikiriki, mnoga su se istraživanja usredotočila na pronalaženje najniže količine alergena koja može izazvati alergijsku reakciju na kikiriki uz pomoć dvostruko slijepog placebo kontroliranog izazivača hrane (DBPCFC). Rezultati istraživanja smatraju se pozitivnim kada se pojave objektivni simptomi (teško disanje, povraćanje, proljev, oticanje usne šupljine, promuklost) ili kada se subjektivni simptomi (svrbež kože ili usne šupljine, mučnina, bol u trbuhu) više puta pojave nakon aktivne doze (Sampson, 1988). Količina praga se može definirati kao najniža količina proteina kikirikija ili kikirikija koja izaziva pozitivnu reakciju (Wensing i sur., 2002). Stoga se ona nalazi između razine neprimijećenih štetnih učinaka (NOAEL) i najniže razine primijećenih štetnih učinaka (LOAEL) (Madsen, 2001). Tijekom istraživanja također utvrđeno kako pacijenti s teškim reakcijama reagiraju na niže količine u odnosu na bolesnike s blagim simptomima (Wensing i sur., 2002).

IgE i mastociti su dvije glavne značajke u alergijskim reakcijama na kikiriki. IgE je vrsta imunoglobulina koji cirkulira u krvnim žilama i ima najmanji životni vijek od svih imunoglobulina i u najmanjoj koncentraciji od svih se nalazi u serumu (Harlow i Lane, 1999). IgE ima visoki afinitet prema receptorima mastocita koji se nalaze u područjima koja su tipična za alergijske reakcije; krvne žile u vezivnom tkivu, u sluznici probavnog sustava i pluća te u koži (Benjamini i Leskowitz, 1991). Postoji pet koraka koji doprinose alergijskim reakcijama na kikiriki:

prezentacija antigena, proizvodnja IgE, aktiviranje mastocita, otpuštanje medijatora upale te u konačnici ispoljavanje simptoma (Wen i sur., 2007).

Alergijska senzabilizacija započinje nakon unosa kikirikija i tada alergeni kikirikija prolaze kroz crijevnu sluznicu. Antigen stanica kao što su makrofagi, dendritičke stanice ili B-limfociti uzimaju alergene endocitozom ili fagocitozom. Nakon što se alergeni internaliziraju, oni se pregrađuju u peptide i vežu na glavni histokompatibilni kompleks klase II (MHC klasa II) i tako formiraju peptidne komplekse MHC klase II. Kompleksi se prenose u plazmu membrane pri čemu su peptidi predstavljeni CD4+T-pomagačkim-2 (Th-2) stanicama i ta se faza naziva predstavljanje antigena. Interakcija između peptidnih kompleksa MHC klase II i T-staničnih receptora na Th-2 aktivira T-pomoćne stanice i stimulira proizvodnju limfokina poput interleukina-4 koji aktiviraju B-stanice. Aktivirane B-stanice započinju proliferaciju, diferencijaciju i sintezu IgE. Sintetizirana antitijela IgE izlučuju se u krvotok i vežu na receptore mastocita ili bazofila (Wraith i sur., 1989; De Vries i sur., 1991; Romagnani 1991). Nakon što je osoba s nutritivnom alergijom ponovno izložena kikirikiju, alergeni kikirikija se vežu na površinu mastocita preko vezanih IgE. Obzirom da jedan alergen ima više od jednog epitopa, može vezati nekoliko različitih IgE antitijela i tako umrežiti nekoliko različitih IgE što izaziva degranulaciju unutar mastocita. Taj korak naziva se aktivacija mastocita. Reakcija degranulacije otpušta medijatore i tako započinju alergijski simptomi nutritivne alergije na kikiriki (Lehrer i sur., 1996). Oslobođeni medijatori mogu se svrstati u dvije skupine. Jednu skupinu čine posredni medijatori poput histamina, koji nastaje dekarboksilacijom histidina i može izazvati suženje glatkih mišića ili povećanje vaskularne propusnosti. Drugu skupinu medijatora čine novo sintetizirani medijatori prostaglandini i leukotrieni, a oni su kemotaktični za neutrofile, bazofile, eozinofile i monocite. Proizvodnja ove skupine temelji se na pretvorbi fosfolipida staničnih membrana. Leukotrieni mogu izazvati dugotrajno suženje glatkih mišića, dok prostaglandini mogu izazvati suženje bronha (Lehrer i sur., 1996). Simptomi nutritivne alergije na kikiriki se javljaju po cijelom tijelu, od manjih simptoma poput svrbeža na jeziku ili bolova u trbuhu, povraćanja, dijareje, do teških sustavnih reakcija (anafilaksije), uključujući stezanje dišnih puteva, kašalj, promuklost, pad krvnog tlaka (hipotenzija), gubitak svijesti ili čak smrt (Benjamini i Leskowitz 1991).



prezentacija antigena → sinteza IgE → aktivacija mastocita → otpuštanje medijatora → pojava simptoma

Slika 1. Mehanizam alergijske reakcije na kikiriki (Benjamini and Leskowitz 1991; Kay 2001; Lehrer and others 2002; Merz 2003; Bohle 2004)

Pored izloženosti kikirikiju razvija se i alergija na kikiriki ovisno o načinu pripreme kikirikija (Beyer i sur., 2001). Alergija na kikiriki obično se smatra bolesti razvijenih zemalja gdje se najčešće konzumira prženi kikiriki (Hourihane, 2002). Alergija na kikiriki je manje rasprostranjena u Kini jer se, smatra se, kikiriki konzumira kuhan ili pečen, a ne pržen kao u razvijenijim zemljama. Prženje može povećati razinu naprednog glikacijskog kraja koji je otporniji na razgradnju kiselinom i ima pozitivnu povezanost s povećanom alergenošću (Chung i Champagne, 2001; Mondoulet i sur., 2005). S druge strane, pojedina istraživanja pokazuju kako je kuhanje uzrokovalo dvostruko smanjenje alergnosti kikirikija, smatra se zbog uklanjanja alergena niske molekulske mase iz kikirikija tijekom kuhanja u vodi (Mondoulet i sur., 2005).

Istraženo je više različitih potencijalnih terapija u slučaju nutritivne alergije na kikiriki (Burks i sur., 2004; Nowak-Wegrzyn i Sampson 2004; Li 2005). Imunoterapija se temelji na blokiranju vezanja IgE na mastocite. Ovo blokiranje inhibira alergijske reakcije u ranoj fazi i može učinkovito zaustaviti alergijske simptome prije nego što počnu (Sampson, 2001). Mutirana imunoterapija proteinima koristi glavne alergene u kojima su mjesta vezivanja IgE promijenjena mijenjanjem primarnog niza aminokiselina (Stanley i sur., 1997). Imunizacija DNA je metoda terapije koja uključuje protein kikirikija koji kodira DNA. Pristup rezultira endogenom proizvodnjom alergernih proteina, što može rezultirati netolerancijom umjesto

alergenosti (Spiegelberg i sur., 1997). Imunizacija imunostimulirajućim sekvencama (ISS) temelji se na sposobnosti ISS da stimulira ACP i prirodne stanice ubojice da luče IFN- γ i IL-12, promičući imunološku devijaciju od alergijskog Th-2 fenotipa do tolerantnog Th-1 fenotipa (Chu i sur., 1997). Imunoterapija na peptide koristi ekstrakt kikirikija koji je probavljen pepsinom. Rezultati studije pokazuju da ekstrakt probavljen pepsinom sadrži epitope T-stanica umjesto epitopa koji vezuju IgE, tako da je reaktivnost IgE bila eliminirana, ali reaktivnost T-stanica je održana (Hong i sur., 1999). Li i suradnici (2001) istraživali su i tradicionalnu kinesku terapiju (Li i sur., 2001).

2.3. Metode određivanja alergena kikirikija

Zbog učestale konzumacije namirnica koje sadrže kikiriki, nepravilnog označavanja te kontaminacije kikirikijem sirovina ili u proizvodnji, mogu se pojaviti tragovi kikirikija u hrani koja ih ne bi trebala sadržavati, što predstavlja potencijalni rizik za pojedince s nutritivnom alergijom na kikiriki (Koppelman i sur., 1996; Whitaker i sur., 2005). Stoga su potrebne pouzdane metode detekcije alergena kikirikija za osiguranje usklađenosti s označavanjem hrane i za poboljšanje zaštite potrošača. Međutim, detekcija alergena u hrani može biti vrlo otežana, budući da su alergeni često prisutni u tragovima i mogu biti maskirani prehrambenom matricom (Poms i sur., 2004). Prema općem dogovoru, smatralo se da detekcijski limit metode za određivanje alergena u različitim namirnicama mora biti između 1 i 100 mg kg⁻¹ (Koppelman i sur., 1996). Osim osjetljivosti, specifičnost je još jedan zahtjev u razvoju analitičke metode za detekciju alergena u hrani (Krska i sur., 2004).

2.3.1. Imunoanalitičke metode

Za detektiranje potencijalnih alergena kikirikija primjenjuje se nekoliko analitičkih metoda. Te analitičke metode ciljaju na proteine kikirikija ili fragmente DNA koji kodiraju alergene kikirikija (Wen i sur., 2007). Ove analitičke metode se dijele u dvije skupine metoda: metode temeljene na proteinima i metode temeljene na DNA (Koppelman i sur., 1996). Metode temeljene na proteinima mogu otkriti ukupan broj proteina kikirikija ili specifične alergene kikirikija. Metode koje se ubrajaju u ovu kategoriju su: dot-imunološko blotanje (engl. *dot immunoblotting*), „rocket” imunoelktroforeza (engl. *Rocket Immuno-Electrophoresis*, RIE), imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), radioalergosorbent test (engl. *Radio-Allergosorbent Test*, RAST), radioimunotest (engl. *Radio-Immunoassay*, RIA), imunokromatografski test (engl. *dipsticks*), lateralni protočni test (eng. *Lateral-Flow*

Immunoassay, LFIA) te tekućinska kromatografija i višestruka spektrometrija masa (engl. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS. Dot-imunološko blotanje, imunokromatografski test, RIE i LFIA pripadaju kvalitativnim metodama, dok se ELISA, RAST, RIA i LC-MS/MS ubrajaju u skupinu kvantitativnih metoda (Poms i sur., 2004). Imunoanalitičke metode se upotrebljavaju s obzirom na specifičnost i osjetljivost antitijela. Najčešće se koriste u prehrambenoj industriji, istraživačkim laboratorijima i vladinim ustanovama za otkrivanje i kvantifikaciju prisutnosti alergena u hrani (Poms i sur., 2004). Analize na bazi proteina za otkrivanje potencijalnih alergena kikirikija mogu se podijeliti u dvije skupine testova: testovi za otkrivanje proteina i testovi za ispitivanje alergena (Krska i sur., 2004). Testovi za ispitivanje alergena usmjereni su na specifične alergene kikirikija, dok se uz pomoć testova za otkrivanje proteina određuju ukupni proteini kikirikija. Na taj način se testovima za otkrivanje proteina lakše određuje široki raspon proteina kikirikija pri niskim razinama. Najčešća metoda na bazi otkrivanja proteina koja se koristi je ELISA metoda zbog visoke preciznosti, jednostavnog rukovanja i dobrog potencijala za standardizaciju (Poms i sur., 2004).

2.3.2. Molekularno-genetske metode

Molekularno-genetske metode su metode koje se temelje na umnažanju i analizi molekule deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Za analize DNK uglavnom se koristi lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) i njene brojne modifikacije te elektroforeza u umreženom polimeru agaroznog ili poliakrilamidnog gela. PCR je brza, jednostavna i specifična metoda u kojoj se za umnažanje specifičnog dijela molekule DNK koriste različiti termostabilni enzimi polimeraze DNK (Butorac i sur., 2013).

Postoje dvije vrste PCR metode koje se koriste za detekciju alergena kikirikija: RT-PCR (*Real Time PCR*) i DNA ELISA metoda. Granica detekcije je ispod 10 ppm (Hefle, 2006). Ovisno o hrani i načinu prerade, DNA može biti u potpunosti razgrađena i posljedično time može doći do lažnih negativnih rezultata, a hrana u sebi može sadržavati alergen. Međutim, DNA se lako ekstrahira u teškim uvjetima i manje se izvlači iz prehrambenih matrica u usporedbi s proteinima. PCR metode detektiraju DNA iz datog uzorka hrane, ali ne i prisutnost specifičnog alergena iz uzorka te time može doći do lažnih rezultata, dok ELISA metoda otkriva proteine iz uzorka hrane. Prednost PCR metode je u brzom ispitivanju od 7 do 10 dana kada je poznata sekvenca DNA. Razvoj ELISA testova može trajati mjesecima ukoliko specifični protein mora biti pročišćen, a ukoliko se stvaraju specifična antitijela može se produljiti još jedan mjesec.

PCR tehnike se zasnivaju na jednostavnom i definiranom slijedu DNA, dok ELISA testovi uključuju životinjska antitijela koja se moraju održavati u stalnoj kvaliteti. Metode temeljene na DNA neće zamijeniti metode temeljene na proteinima već će postojati kao dodatne i komplementarne metode (Mustorp i sur., 2007).

2.4. ELISA metoda u određivanju nutritivnih alergena

2.4.1. Općenito o ELISA metodi

ELISA metoda omogućuje određivanje prisutnosti i količine antigena. Reakcija se temelji na vezanju antitijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje. ELISA metodom moguće je odrediti vrlo nisku koncentraciju analita od nekoliko ng po kg analiziranog uzorka (Butorac i sur., 2013). Primjena ELISA testova je vrlo raširena u forenzici hrane i koristi se pri određivanju alergena u namirnicama kao što su mlijeko, kikiriki, lješnjak, jaja i sl., a uporabu pronalazi i pri utvrđivanju kontaminacije mikroorganizmima, pesticidima i antibioticima (Chen i sur., 2012). ELISA metoda je metoda koja se najčešće koristi u prehrambenoj industriji i agencijama za kontrolu hrane (Van Hengel, 2007). Pomès i suradnici (2003) određivali su udio alergena kikirikija Ara h 1 ELISA metodom u 83 različita prehrambena proizvoda. Udio alergena Ara h 1 kretao se u rasponu od $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ do $500 \mu\text{g g}^{-1}$. Utvrdili su da se ova metoda može koristiti za praćenje eventualne kontaminacije alergenom Ara h 1 tijekom procesa proizvodnje te za određivanje najniže količine (0,2 mg) pri kojoj dolazi do senzibilizacije u osoba koje s nutritivnom alergijom na kikiriki. Prednosti ELISA metode su: brzo i jednostavno korištenje, prikladan i standardiziran format određenog broja jažica, osjetljivost, selektivnost na tragove alergena, dostupnost reagensa, brza obrada podataka, niski početni troškovi i prenosivost. Nedostaci su: dugotrajno razvojno vrijeme, moguća križna kontaminacija, učinci matrice, mogući pozitivni rezultati, utvrđivanje pozitivnih rezultata i analiza više sastojaka istovremeno (Koppelman i Hefle, 2006).

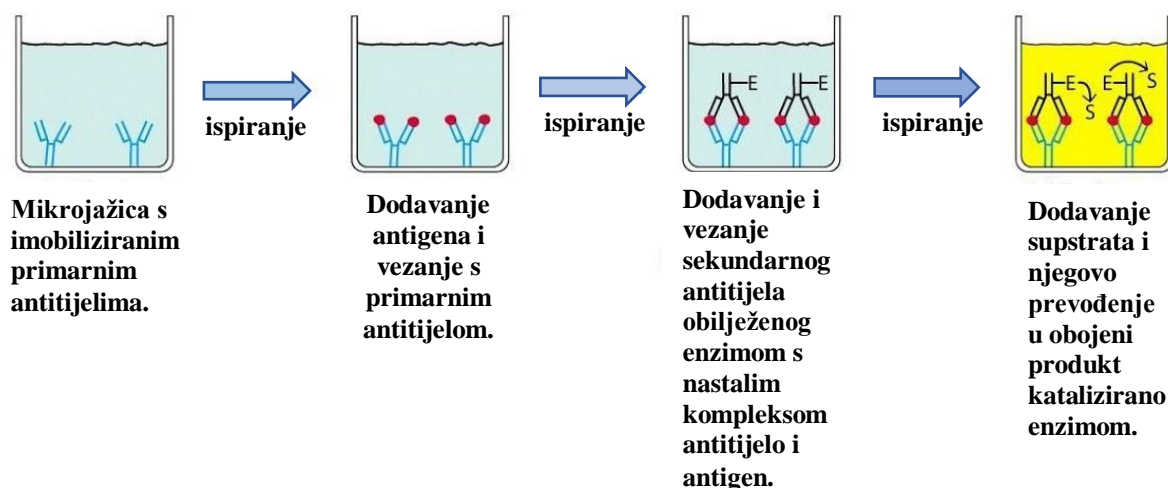
2.4.2. ELISA testovi

Postoje više tehnika imunološkog određivanja pomoću ELISA testa: indirektna, „sandwich” ili direktna, konkurentna i nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča (Butorac i sur., 2013). U analizi prehrambenih proizvoda najčešće se koriste „sandwich” metoda i konkurentna metoda.

A) Direktni ili „sandwich“ ELISA test

Direktna ili „sandwich“ metoda je najčešća imunološka metoda za detekciju proteina. Omogućuje detekciju i kvantifikaciju specifičnih topljivih proteina (Yeung, 2006). Ova metoda uključuje imobilizirana hvatajuća visoko pročišćena antitijela na mikrojažicama. Nakon dodavanja standardne ili otopine uzorka dolazi do vezanja antigena na antitijelo. Nakon toga slijedi ispiranje čime se uklanja nevezani antigen. Na specifični antigen dodaje se sekundarno enzimom konjugirano antitijelo te ponovno dolazi do vezanja i stvaranja „sendviča“. Zatim se dodaje supstrat koji reagira sa enzimom i stvara obojeni produkt čiji intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski, izmjerena apsorbancija je izravno proporcionalna koncentraciji analita (Besler i sur., 2002). Sendvič metoda je 2-5 puta osjetljivija od ostalih metoda (Aydin, 2015).

„Sandwich“ ELISA



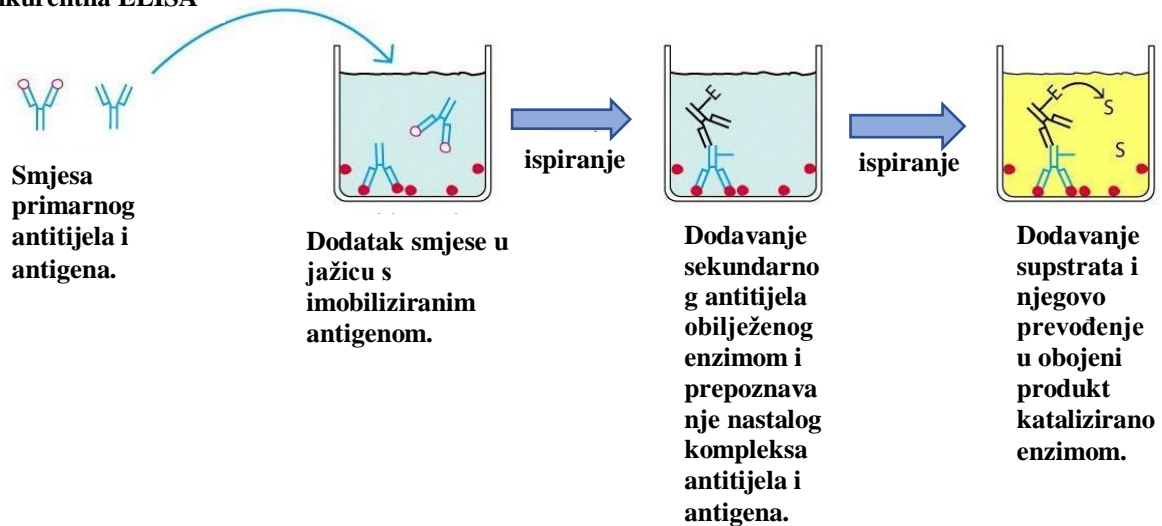
Slika 2. Pojednostavljen prikaz direktne ili „sandwich“ ELISA metode (Anonymuos 1, 2011)

B) Konkurentni ELISA test

Konkurentni ELISA testovi često uključuju antigen imobiliziran na dno mikrojažica. U određene jažice se dodaje određena količina primarnog antitijela i slobodnog antigena (iz uzorka), čime dolazi do kompeticije između slobodnog antigena i imobiliziranog antigena za stvaranje kompleksa sa antitijelom. Nakon toga slijedi ispiranje čime se uklanja nevezani antigen i dodaje se sekundarno enzimom obilježeno konjugirano antitijelo koje prepoznaje i veže se za antigen-antitijelo kompleks. Dodatkom bezbojnog supstrata za enzim dolazi do njegovog prevođenja u obojeni produkt (Slika 3). Međutim, ako u uzorku nisu prisutni antigeni, antitijelo na koje je vezan enzim veže se za imobilizirani antigen što rezultira visokim vrijednostima apsorbancije nastalog obojenog produkta. Što je veća količina slobodnog

antigena u uzorku, posljedično time jača je inhibicija vezanja antitijela obilježenog enzimom na imobilizirani antigen. Koncentracija antigena kod ove metode je obrnuto proporcionalna intenzitetu nastalog obojenja (Besler i sur., 2002), a baždarna krivulja prikazuje tipičan sigmoidalni oblik (Butorac i sur., 2013).

Konkurentna ELISA



Slika 3. Pojednostavljen prikaz konkurentne ELISA metode (Anonymous 1, 2011)

2.5. OZNAČAVANJE ALERGENA

Zahtjev za navođenje alergena prisutnih u hrani je dana 13. prosinca 2014. godine proširen EU zakonodavstvom i na nepretpakiranu hranu. Pri tome je državama članicama dozvoljeno regulirati to područje na razini nacionalnog zakonodavstva. U slučaju da država članica ne donese nacionalni propis o navođenju alergena, isti se moraju voditi prema pravilima utvrđenim u Uredbi (EU) br.1169/2011 o informiranju potrošača u hrani i jednaki su za pakiranu i nepretpakiranu hranu (Ministarstvo poljoprivrede, 2015).

Uredbom (EU) br.1169/2011 se utvrđuje osnova za postizanje visoke razine zaštite potrošača u vezi s informacijama o hrani. Ovom se Uredbom utvrđuju opća načela, zahtjevi i odgovornosti u vezi s informacijama o hrani, a posebno u vezi označavanja hrane. Ova se Uredba primjenjuje na subjekt u poslovanju hranom u svim fazama prehrambenog lanca ako njihove djelatnosti uključuju pružanje informacija o hrani potrošačima (Uredba, 2011).

Informacije o hrani su informacije koje se odnose na hranu, a dostupne su krajnjem potrošaču putem etiketa, drugog popratnog materijala ili na neki drugi način, uključujući sredstva moderne tehnologije ili verbalne komunikacije. Pružanjem informacija o hrani treba se postići visoka razina zaštite zdravlja i interesa potrošača uspostavom temelja pomoću kojih će krajnji

potrošači biti informirani pri odabiru hrane i pomoću kojih će upotrebljavati i koristiti hranu na siguran način, s posebnim naglaskom na zdravstvene, gospodarske, okolišne, socijalne i etičke okolnosti. Cilj propisa o informacijama o hrani jest u Uniji postići slobodan protok hrane koja se zakonito proizvodi i stavlja na tržište, vodeći prema potrebi, računa o zaštiti legitimnih interesa proizvođača te poticati promociju kvalitetnih proizvoda (Uredba, 2011).

Tvari ili proizvodi koji uzrokuju alergiju ili netoleranciju moraju biti navedeni kao ostali sastojci u popisu sastojaka (naziv tvari ili proizvoda), naglašeno uporabom vrste pisma koje se jasno razlikuje od vrste pisma kojim je pisan ostatak popisa sastojaka, na primjer različitim slovima, stilovima ili bojama u pozadini. Ako nema popisa sastojaka, navod podataka mora uključivati riječ „sadrži” iza koje se navodi naziv tvari ili proizvoda. Popis sastojaka mora uključivati sve sastojke hrane navedene padajućim redoslijedom s obzirom na masu koja je utvrđena u vrijeme njihove upotrebe u proizvodnji hrane (Uredba, 2011).

Sastojci dobiveni iz poznatih izvora alergena mogu biti skriveni sastojci ukoliko nisu navedeni u popisu sastojaka (Taylor i Hefle, 2000). Međutim, skriveni sastojci koji se potencijalno mogu izložiti potrošačima mogu doći iz različitih izvora. Korištenje zajedničke opreme i postrojenja, prisutnost alergijskih onečišćenja u sirovinama i ambalaži mogu dovesti do povećanja razine skrivenih sastojaka (Taylor i Hefle, 2005; Warner, 2005).

Jedna od najvažnijih briga za osjetljive potrošače je da se alergen može "skrivati" u prerađenoj hrani. Stoga je jedan od glavnih ciljeva svih regulatornih okvira vezanih uz označavanje prehrambenih alergena korištenje jednostavnog jezika u popisu sastojaka. Na primjer, regulatorni okviri za alergene proteine u SAD-u koriste izvorni naziv hrane (Gendel, 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

U svrhu istraživanja, na zagrebačkom tržištu je prikupljeno 39 uzoraka sladoleda, 19 nepretpakiranih uzoraka u slastičarnicama (SS₁ do SS₁₉) i 20 zapakiranih uzoraka u trgovačkim lancima (ST₁ do ST₂₀). Obzirom na sastav, uzorci sladoleda bili su na bazi vanilije, voća i orašastih plodova te na popisu sastojaka nisu sadržavali kikiriki.

3.1.2. Laboratorijska oprema i pribor

Tijekom istraživanja i laboratorijskih analiza korišteni su sljedeći uređaji:

- ❖ analitička vaga (YMC Chyo, tip JK-180 Mikrotehna, Zagreb)
- ❖ centrifuga (Rorofix 32 A, Hettich, Njemačka) (Slika 4)
- ❖ ELISA-čitač s filterom od 450 nm sa računalnim programom Gen 5, Bio Tek Instruments, SAD (Slika 5)
- ❖ vodena kupelj (INKO, Zagreb) (Slika 6)
- ❖ vortex mješalica (VWR, tip VV3) (Slika 7).



Slika 4. Centrifuga (vlastite fotografije)



Slika 5. ELISA-čitač (vlastite fotografije)



Slika 6. Vodena kupelj (vlastite fotografije)



Slika 7. Vortex mješalica (vlastite fotografije)

Laboratorijsko posuđe i pribor korišteni tijekom istraživanja i laboratorijskih analiza:

- ❖ automatska jednokanalna pipeta
- ❖ električni štapni mikser
- ❖ Erlenmeyerove tikvice od 100 mL
- ❖ Falcon epruvete
- ❖ filter papir
- ❖ laboratorijska čaša od 100 mL
- ❖ laboratorijska čaša od 250 mL
- ❖ nosač za mikrojažice, Agraquant, Romer Labs, Austrija
- ❖ pipeta od 1 mL

- ❖ pipeta od 5 mL
- ❖ pipeta od 10 mL
- ❖ pipeta od 25 mL
- ❖ pipeta od 50 mL
- ❖ nastavak za pipetu
- ❖ odmjerna tikvica od 100 mL
- ❖ odmjerna tikvica od 250 mL
- ❖ stakleni lijevak
- ❖ staničevina
- ❖ plastične žličice
- ❖ sterilne čaše.

3.1.3. Reagensi

- ❖ AgraQuant, Peanut, Extraction & Sample Dilution Buffer, Romer Labs, Austrija (ekstrakcijski pufer)
- ❖ AgraQuant, Peanut, Wash Butter, Romer Labs, Austrija (pufer za ispiranje)
- ❖ AgraQuant-Peanut Enzyme, Romer Labs, Austrija (reagens sa zelenim poklopcem, konjugat) (Slika 8)
- ❖ AgraQuant-Substrate, Romer Labs, Austrija (reagens s plavim poklopcem, supstrat) (Slika 8)
- ❖ AgraQuant-Stop Solution, Romer Labs, Austrija (reagens s crvenim poklopcem, stop otopina) (Slika 8)
- ❖ filtrat pročišćenog uzorka.



Slika 8. Reagensi za ELISA test (vlastite fotografije)

3.1.4. Ispitanici

U svrhu prikupljanja stavova i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji izazivaju alergijske reakcije, proveden je upitnik na uzorku od 167 ispitanika starijih od 18 godina koji su dobrovoljno pristali sudjelovati u provedenom anketiranju.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema reakcijskih otopina

Otopina ekstrakcijskog pufera pripravljena je razrjeđivanjem koncentriranog ekstrakcijskog pufera destiliranom vodom u omjeru 1:10. Pripravljena otopina ekstrakcijskog pufera čuvana je u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C do daljne uporabe. Otopina pufera za ispiranje pripravljena je razrjeđivanjem koncentriranog pufera za ispiranje destiliranom vodom u omjeru 1:10. Dobivena otopina pufera za ispiranje čuvana je u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C do laboratorijskih analiza. Obje otopine su temperirane na sobnu temperaturu prije provođenja laboratorijskih analiza.

3.2.2. Ekstrakcija uzoraka

Prije početka analize, uzorak je homogeniziran, a zatim je na analitičkoj vagi u Falcon epruvetu odvagano 1,000 g. Nakon toga je dodano 20 mL otopine ekstrakcijskog pufera te vorteksirano do potpune homogenizacije uzorka u reakcijskoj otopini. Sadržaj epruvete stavljen je u prethodno zagrijanu vodenu kupelj na 60 °C te zagrijavan 15 minuta uz snažno protresivanje svake 2 minute. Dobivena suspenzija centrifugirana je 10 minuta pri 2000 okretaja kako bi se dobio bistri supernatant. Dobiveni supernatant je na kraju dodatno profiltriran uz pomoć filter papira kako bi se uklonile eventualno prisutne čestice. Dobiveni filtrat predstavljao je uzorak za određivanje potencijalno prisutnih alergena kikirikija ELISA testom.

3.2.3. Analiza uzoraka ELISA testom

3.2.3.1. Princip određivanja

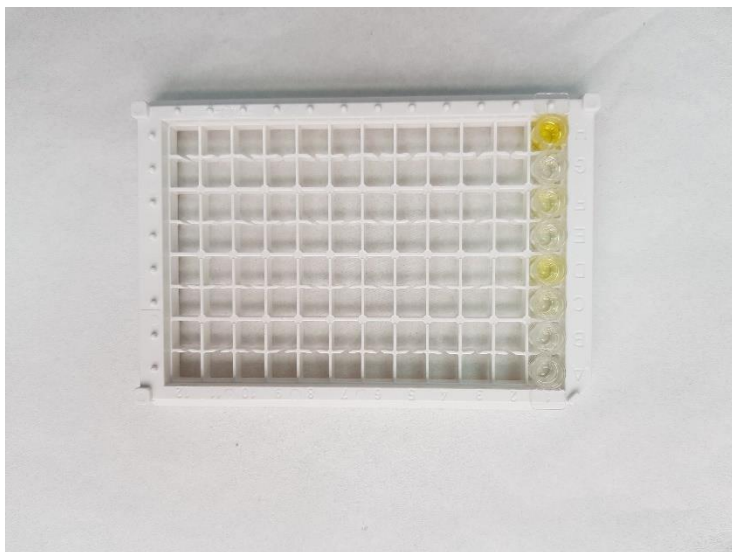
AgraQuant kikiriki test, korišten tijekom ovog istraživanja, prema principu određivanja se ubraja u "sandwich" ELISA test temeljen na imunoenzimskoj reakciji. Proteini kikirikija iz uzorka se ekstrahiraju pomoću ekstrakcijskog pufera. Unutar mikrojažica, koje sadrži set za imunoenzimski test, se u tankom sloju nalaze primarna antitijela. Nanošenjem pripremljenog ekstrakta uzorka u mikrojažice dolazi do vezanja primarnih antitijela i proteina kikirikija. Zatim

slijedi ispiranje puferom za ispiranje čime se uklanjaju nevezani antigeni. Nakon ispiranja, u mikrojažice se dodaje konjugat, odnosno enzimom obloženo sekundarno antitijelo koje se veže na nastali antigen-antitijelo kompleks kroz određeni period inkubacije. Nakon inkubacije provodi se ponovno ispiranje i dodaje se supstrat specifičan za enzim koji uzrokuje razvitak plave boje koja je proporcionalna udjelu kikirikija u uzorku. Nakon određenog vremena inkubiranja dodaje se "stop" otopina koja uzrokuje promjenu plave boje u žutu boju (Slika 9) čime se reakcija zaustavlja. Nastali intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri 450 nm te se na temelju baždarnog dijagrama standarda kikirikija (Slika 10) određuje udio potencijalnih alergena kikirikija (mg kg^{-1}) u uzorcima.

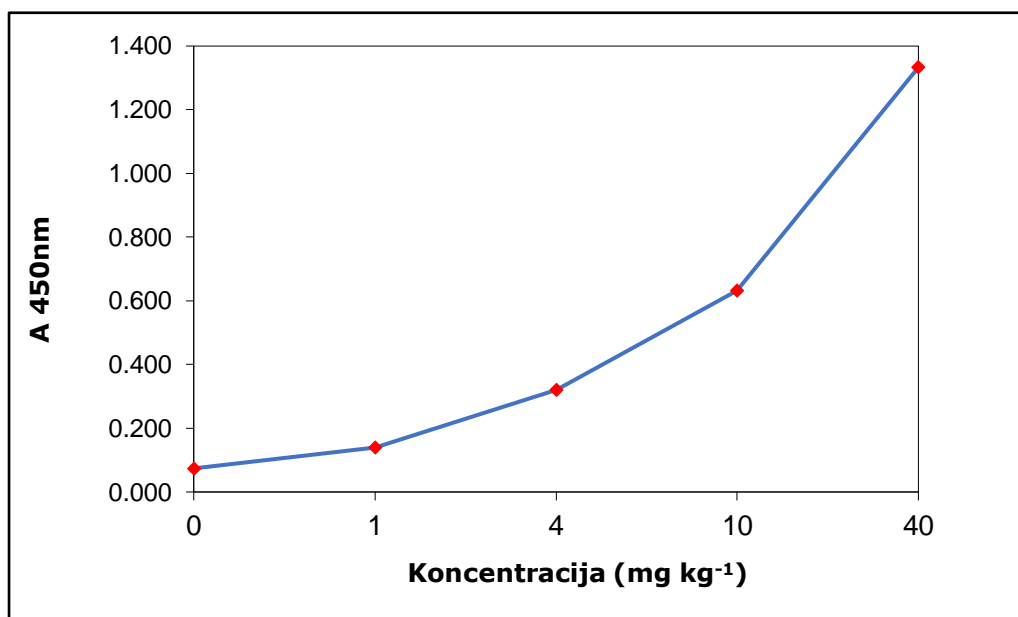
3.2.3.2. Postupak određivanja

Na mikrotitarsku ploču postavljen je držač od 8 mikrojažica obloženih antitijelima. Jednokanalnom automatskom pipetom dodano je po 100 μL pripremljenih pročišćenih filtrata uzoraka u svaku od 8 jažica. Držač s jažicama potom je stavljen na inkubaciju u trajanju od 20 min pri sobnoj temperaturi. Pri pomicanju ploče s jažicama postupano je oprezno i bez protresanja mikrotitarske ploče kako ne bi došlo do međusobnog miješanja sadržaja i kontaminacije. Nakon inkubacije sadržaj jažica je brzim okretanjem ploče ispražnjen u otpadni spremnik. Nakon toga slijedilo je ispiranje otopinom pufera za ispiranje. Ispiranje je provedeno tako da je svaka jažica isprana 5 puta dodatkom 100 μL razrijeđenog pufera za ispiranje te nakon svakog ispiranja sadržaj u jažicama brzim okretanjem ploče ispražnjen u otpadni spremnik. Nakon ispiranja sadržaj jažica je osušen tapkanjem po staničevini. Postupak je nastavljen dodavanjem po 100 μL reagensa koji u sebi sadrži sekundarna antitijela konjugirana s enzimima. Zatim je opet slijedila inkubacija u trajanju od 20 minuta. Nakon inkubacije ponovljen je postupak ispiranja mikrojažica razrijeđenim puferom za ispiranje. Ispiranje je također ponovljeno 5 puta dodatkom 100 μL razrijeđenog pufera za ispiranje, a između svakog ispiranja sadržaj je ispražnjen u otpadni spremnik. Nakon što su mikrojažice osušene tapkanjem po staničevini, u mikrojažice je otpipetirano po 100 μL reagensa koji u sebi sadrži supstrat za enzim te je ponovno provedena inkubacija u trajanju od 20 minuta, u ovom slučaju u tami. Nakon inkubacije u tami, otpipetirano je po 100 μL "stop" otopine u mikrojažice pri čemu je došlo do promjene plave boje u žutu boju (Slika 9). Odmah je slijedio postupak mjerenja pri čemu je mikrotitarska ploča sa držačem oprezno prenesena do ELISA čitača s filterom od 450 nm te je pokrenut računalni program za očitavanje apsorbancije. Udio alergena u analiziranim

uzorcima određen je pomoću prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda kikirikija (Slika 10), pri čemu su koncentracije iznosile 0, 1, 4, 10 i 40 mg kg⁻¹.



Slika 9. Držać s mikrojažicama (vlastite fotografije)



Slika 10. Baždarni dijagram standarda kikirikija

3.2.4. Upitnik o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije

Svrha upitnika provedenog tijekom ovog istraživanja bila je prikupiti stavove i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. U upitniku je sudjelovalo 167 ispitanika koji su dobrovoljno pristupili ispunjavanju upitnika. Ispitanici su bili stariji od 18 godina, a anketa je provedena na području grada Zagreba i Velike Gorice. Upitnik se sastojao od dvije grupe pitanja: prva grupa pitanja bila je vezana za socio-demografske karakteristike ispitanika, dok je druga grupa pitanja bila je vezana uz kikiriki kao česti nutritivni alergen.

3.2.5. Obrada rezultata

Dobiveni rezultati analizirani su pomoću Microsoft Excel 2013 programa. Za prikaz rezultata korištene su metode deskriptivne statistike (\bar{X} - srednja vrijednost, SD - standardna devijacija, udio ispitanika - %).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ovim istraživanjem, imunoenzimskim ELISA testom, određen je udio potencijalnih alergena kikirikija u trideset i devet uzoraka sladoleda prikupljenih u slastičarnicama i trgovačkim lancima, a dobiveni rezultati uspoređeni su sa navodima o prisutnosti alergena u okviru informacija o hrani analiziranih proizvoda. Osim analiza ELISA testom, tijekom istraživanja također je proveden upitnik s ciljem prikupljanja mišljenja i stavova potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Rezultati određivanja udjela potencijalnih alergena kikirikija (mg kg^{-1}) prikazani su u Tablicama 1, 2 i 3, a stavovi i mišljenja potrošača, grafički na Slikama 11-20.

4.1. UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA SLADOLEDA

Udio potencijalnih alergena kikirikija u trideset i devet uzoraka sladoleda, devetnaest prikupljenih u slastičarnicama (uzorci označeni oznakama od SS₁ do SS₁₉) i dvadeset prikupljenih u trgovačkim lancima (uzorci označeni oznakama od ST₁ do ST₂₀), određen je imunoenzimskim ELISA testom. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 1-2. Analitički rezultati uspoređeni su također sa navodima u okviru pripadajućih informacija o hrani analiziranih proizvoda (Tablica 3).

U Tablici 1 prikazani su rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima sladoleda prikupljenih u slastičarnicama.

Tablica 1. Udio alergena [mg kg^{-1}] kikirikija u uzorcima (n=19) sladoleda prikupljenih u slastičarnicama

UZORAK	Udio alergena kikirikija [mg kg^{-1}]
	Srednja vrijednost (\pm SD)
SS ₁	1,41 \pm 0,001
SS ₂	0,22 \pm 0,000
SS ₃	0,35 \pm 0,000
SS ₄	1,23 \pm 0,000

Tablica 1. (nastavak) Udio alergena [mg kg⁻¹] kikirikija u uzorcima (n=19) sladoleda prikupljenih u slastičarnicama

SS ₅	< LOD*
SS ₆	0,37 ± 0,000
SS ₇	0,48 ± 0,001
SS ₈	0,42 ± 0,000
SS ₉	1,16 ± 0,000
SS ₁₀	2,85 ± 0,002
SS ₁₁	0,53 ± 0,001
SS ₁₂	12,22 ± 0,001
SS ₁₃	0,80 ± 0,000
SS ₁₄	< LOD*
SS ₁₅	0,58 ± 0,000
SS ₁₆	0,15 ± 0,000
SS ₁₇	< LOD*
SS ₁₈	0,12 ± 0,000
SS ₁₉	< LOD*
Prosječna vrijednost	1,53
Raspon	0,15-12,22

*limit detekcije

Prisutnost alergena kikirikija detektirana je u svim uzorcima osim u četiri uzorka; "SS₅", "SS₁₄", "SS₁₇" i "SS₁₉" gdje se nalazi ispod limita detekcije koji za ovu metodu iznosi 0,10 mg kg⁻¹. Promatrajući uzorke u kojima je detektirana prisutnost alergena kikirikija, vidljivo je da se dobivene analitičke vrijednosti kreću u rasponu od 0,15 mg kg⁻¹ ("SS₁₆") do 12,22 mg kg⁻¹ ("SS₁₂"), dok prosječna vrijednost iznosi 1,53 mg kg⁻¹.

Slastičarnice kao subjekti u poslovanju s hranom, prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 obavezne su informirati kupce o mogućoj prisutnosti alergena u hrani bilo usmenim ili pisanim putem (Uredba, 2011). Informacije vezane za moguću prisutnost alergena u uzorcima "SS₁"- "SS₂₀" dobivene su usmenim putem i napomenuto je da ne postoji mogućnost prisutnosti alergena kikirikija u odabranim uzorcima. Obzirom da rezultati analiza dobiveni ELISA testom pokazuju prisutnost alergena kikirikija u pojedinim uzorcima, potrebna je dodatna pažnja kod pružanja informacija kupcima.

Pele i suradnici (2007) analizirali su sadržaj kikirikija u 544 proizvoda (keks i čokolada) iz 10 europskih zemalja. Dok je 108/333 (32 %) pakirane hrane sa savjetodavnom oznakom imalo tragove onečišćenja kikirikijem, postotak onečišćenja za proizvode bez savjetodavnih oznaka bio je i dalje jak visok (52/211 (25%). Odabrana je koncentracija od 20 ppm kao pokazatelj značajnog onečišćenja, međutim nije uočena velika razlika u učestalosti onečišćenja između proizvoda sa savjetodavnom oznakom (55/333,17 %) i proizvoda bez savjetodavne oznake (24/211, 11%). Odnosno, za osobu alergičnu na kikiriki postojao je rizik da u jednom od šest konzumiranih keksa ili čokoladice sa savjetodavnom oznakom naiđe na alergene kikirikija, dok je za konzumirane kekse ili čokoladice bez savjetodavne oznake postojao rizik da u jednom od devet proizvoda naiđe na alergene kikirikija (Pele i sur., 2007).

Furlong i suradnici (2001) istraživali su alergijske reakcije na kikiriki i orašaste plodove u hrani kupljenoj u azijskim restoranima, slastičarnicama i pekarnicama. Istraživanje je provedeno telefonski gdje su uz pomoć upitnika nasumično ispitani ispitanici izabrani između 709 osoba koje se nalaze u registru SAD-u kao osobe koje imaju alergijske reakcije na kikiriki i orašaste plodove. Prikupljeni su podaci za 156 slučajeva (29 slučajeva prvi put imali alergijsku reakciju). Najviše alergijskih reakcija bilo je uzrokovano kikirikijem (67 %), orašastim plodovima (24 %), dok su neke reakcije (9 %) bile izazvane kombinacijom kikirikija i orašastih plodova ili su bile nepoznate. Simptomi su započeli 5 minuta nakon izlaganja i čak 27 % osoba imalo je teške posljedice. Od 106 ispitanika s prethodno dijagnosticiranim alergijama, samo 45 % ispitanika dalo je informaciju ustanovi o alergiji od koje pate. Za 83 (78 %) od 106 ispitanika, zaposlenici u ustanovi utvrdili su podatke da je konzumirana hrana sadržavala kikiriki ili orašaste plodove, dok su za 50 % slučajeva alergeni bili skriveni te je onemogućena vizualna identifikacija. Kod 23 (22 %) od 106 ispitanika, izloženost je uzrokovana korištenjem istog kuhinjskog posuđa. Kod preostalog 21 ispitanika s prethodno dijagnosticiranom alergijskom reakcijom, reakcije su izazvane kontaktom kožom ili gutanjem hrane koja nije bila namijenjena njima (ostaci hrane na stolovima, ljuske kikirikija na podu, mala udaljenost kuhinje od stola itd.). Zaključeno je da restorani, slastičarnice i ostali ugostiteljski objekti predstavljaju veliku opasnost za pojedince

koji pate od alergije na kikiriki i orašaste plodove zbog mogućih križnih kontaminacija i neočekivanih sastojaka u hrani (Furlong i sur., 2001).

U Tablici 2 prikazani su rezultati određivanja udjela potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima sladoleda prikupljenih u trgovačkim lancima.

Tablica 2. Udio alergena [mg kg^{-1}] kikirikija u uzorcima ($n=20$) sladoleda prikupljenih u trgovačkim lancima

UZORAK	Udio alergena kikirikija [mg kg^{-1}]
	Srednja vrijednost (\pm SD)
ST ₁	0,28 \pm 0,000
ST ₂	0,38 \pm 0,000
ST ₃	1,51 \pm 0,000
ST ₄	1,16 \pm 0,000
ST ₅	< LOD*
ST ₆	< LOD*
ST ₇	< LOD*
ST ₈	1,36 \pm 0,001
ST ₉	0,21 \pm 0,001
ST ₁₀	0,32 \pm 0,000
ST ₁₁	1,42 \pm 0,001
ST ₁₂	5,44 \pm 0,002
ST ₁₃	< LOD*
ST ₁₄	< LOD*
ST ₁₅	< LOD*

*limit detekcije

Tablica 2. (nastavak) Udio alergena [mg kg⁻¹] kikirikija u uzorcima (n=20) sladoleda prikupljenih u trgovačkim lancima

ST ₁₆	< LOD*
ST ₁₇	< LOD*
ST ₁₈	0,23 ± 0,000
ST ₁₉	0,22 ± 0,000
ST ₂₀	0,20 ± 0,000
Prosječna vrijednost	1,06
Raspon	0,20-5,44

*limit detekcije

Udio alergena kikirikija kod osam uzoraka sladoleda prikupljenih u trgovačkim lancima ("ST₅", "ST₆" i "ST₇" "ST₁₃", "ST₁₄", "ST₁₅", "ST₁₆" i "ST₁₇") nalazi se ispod limita detekcije koji za korištenu ELISA metodu iznosi 0,10 mg kg⁻¹. U ostalim analiziranim uzorcima detektirana je prisutnost alergena kikirikija, a dobivene analitičke vrijednosti kreću se u rasponu od 0,20 mg kg⁻¹ ("ST₂₀") do 5,44 mg kg⁻¹ ("ST₁₂"). Prosječna vrijednost iznosi 1,06 mg kg⁻¹. Uspoređujući analitičke rezultate sa navodima u okviru informacija o hrani analiziranih proizvoda, vezanim uz prisutnost alergena kikirikija (Tablica 3), vidljivo je da osam uzoraka u kojima nisu detektirani alergeni kikirikija sadrži navod vezan uz prisutnost alergena kikirikija, osim uzorka "ST₁₅" koji sadrži navod vezan uz prisutnost orašastog voća (Tablica 3). U ostalim uzorcima sladoleda iz trgovačkih lanaca detektirani su alergeni kikirikija što se podudara sa navodima na deklaraciji proizvoda. Proizvođači često odlučuju označiti proizvode navodom "može sadržavati" ukoliko ne mogu jamčiti odsustvo alergena. Međutim, postavljanje ovakvih navoda iz predostrožnosti može i nepotrebno ograničiti potrošača u konzumaciji tog proizvoda (Spanjersberg i sur., 2010). Ipak, oprez je potreban jer postoje brojne individualne razlike, posebno u slučaju kikirikija, obzirom na količine alergena koje mogu izazvati alergijske reakcije u osjetljivih pojedinaca (Taylor i sur., 2002; Hourihane i sur.,1997). Teško je predvidjeti izostavljanje navoda u slučaju kontaminiranih proizvoda ili navođenje sadržaja alergena u slučaju izostanka ili pak neznatne kontaminacije, te bi se deklariranje slučajne ili nenamjerne prisutnosti zakonski obveznih alergena trebalo temeljiti na analizi opasnosti i procjeni pripadajućih rizika (Puhač Bogadi, 2016; Spanjersberg i sur., 2010).

Tablica 3. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca vezani uz prisustvo alergena kikirikija

UZORAK	Navod u okviru informacija o hrani vezan uz prisustvo alergena kikirikija
ST ₁	Može sadržavati tragove orašastog voća.
ST ₂	Može sadržavati kikiriki, jaja, gluten i orašasto voće.
ST ₃	Može sadržavati tragove kikirikija i orašastog voća.
ST ₄	Može sadržavati kikiriki, jaja i orašasto voće.
ST ₅	Može sadržavati tragove kikirikija, ostalog orašastog voća i jaja.
ST ₆	Može sadržavati kikiriki, gluten i orašasto voće.
ST ₇	Može sadržavati tragove ostalog orašastog voća i kikirikija.
ST ₈	Može sadržavati tragove ostalog orašastog voća.
ST ₉	Može sadržavati tragove kikirikija i orašastog voća.
ST ₁₀	Može sadržavati kikiriki, jaja, gluten i ostalo orašasto voće.
ST ₁₁	Može sadržavati orašasto voće i kikiriki.
ST ₁₂	Može sadržavati kikiriki, jaja i ostalo orašasto voće.
ST ₁₃	Može sadržavati kikiriki, jaja, gluten i ostalo orašasto voće.
ST ₁₄	Može sadržavati tragove soje, kikirikija i orašastog voća.
ST ₁₅	Može sadržavati orašasto voće u tragovima.
ST ₁₆	Može sadržavati ostale orašasto voće, soju i kikiriki.
ST ₁₇	Može sadržavati tragove kikirikija i orašastog voća.
ST ₁₈	Može sadržavati kikiriki, jaja i orašasto voće.
ST ₁₉	Može sadržavati kikiriki, jaja i orašasto voće.
ST ₂₀	Može sadržavati tragove ostalog orašastog voća i kikirikija.

Iz Tablice 3 vidljivo je također da navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca vezani uz prisustvo alergena, uz alergene kikirikija sadrže i ostale

česte alergene koji se pojavljuju u uzorcima sladoleda što je sukladno Uredbi (EU) br.1169/2011 o informiranju potrošača o hrani (Uredba, 2011).

Zagon i suradnici (2015) su u sklopu francuskog istraživačkog projekta "MIRABEL" istraživali tragove proteina kikirikija u 899 uzorka pakirane hrane koja u sebi ne sadrži kikiriki, a uzorci su podijeljeni u deset prehrambenih kategorija (pahuljice, pločice od žitarica, kruh i pekarski proizvodi, pizza, kremasti deserti, mousse i svježi deserti, keksi i peciva, čokoladne pločice, čokoladni namaz, ostali čokoladni proizvodi, sladoled). Za učinkovitiju analizu korištene su tri detekcijske metode. Kao prva metoda korištena je "*Lateral flow immunoassay*" (imunokromatografska metoda) s limitom detekcije od 2 mg kg⁻¹ kikirikija ili 0,5 mg kg⁻¹ proteina kikirikija. Pozitivno je bilo 139 uzoraka, a rezultat je potvrđen drugom, odnosno real-time PCR metodom. Uzorci koji su bili pozitivni u obje detekcijske metode analizirani su i ELISA testom. Pomoću ELISA testa utvrđeno je da samo 1 % (9/899) sadrži mjerljive količine proteina kikirikija. U šest uzoraka detektirano je < 5 mg ukupnih proteina kikirikija, pri čemu su dva uzorka sadržavala između 8 i 10 mg kg⁻¹ te jedan uzorak maksimalno 20 mg kg⁻¹. Zaključeno je kako su primijenjene metode izvrsne u svrhu detekcije tragova kikirikija jer mogu detektirati količine niže od 2 ppm (Zagon i sur., 2015).

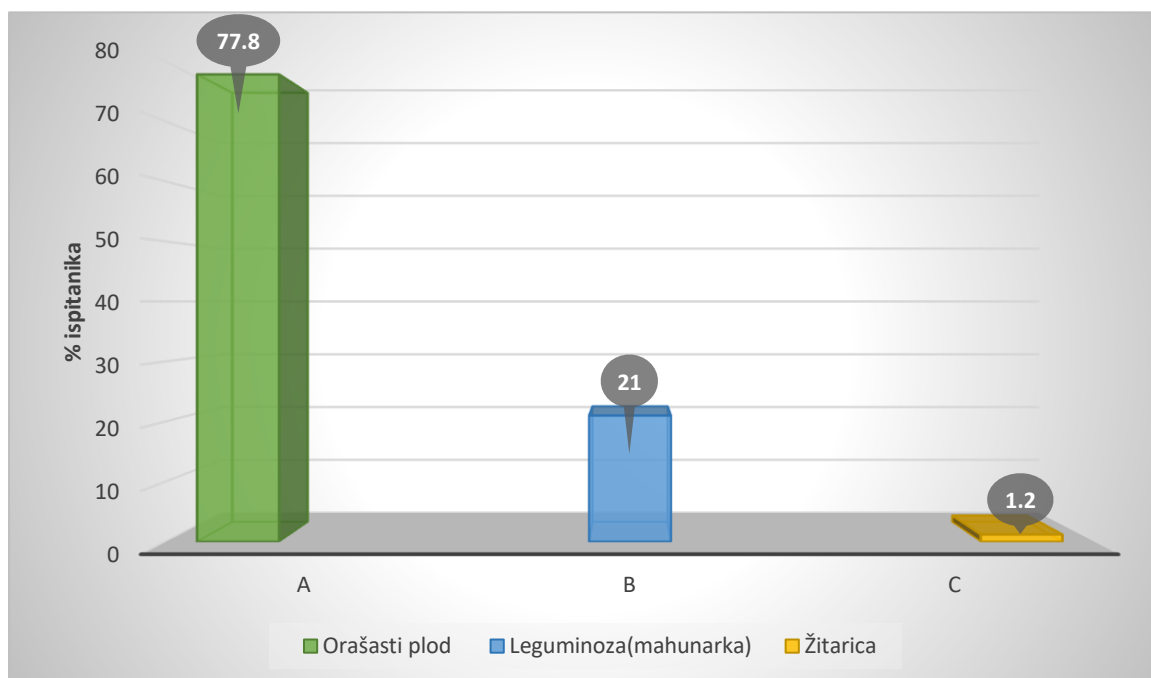
4.2. STAVOVI I MIŠLJENJA POTROŠAČA O KIKIRIKIJU I PROIZVODIMA OD KIKIRIKIJA KAO TVARIMA ILI PROIZVODIMA KOJI UZROKUJU ALERGIJE

Tijekom ovog istraživanja prikupljena su i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije uz pomoć posebno osmišljenog upitnika. Upitnik je ispunilo 167 osoba, a prikupljeni podaci su prikazani tablično i grafički. Prvi dio Upitnika bio je vezan uz socio-demografske karakteristike ispitanika, a prikupljeni podaci prikazani su u Tablici 4. Od sveukupno 167 ispitanika, 140 osoba (83,8 %) pripada ženskom spolu dok preostalih 27 (16,2 %) pripada muškom spolu. Najveći dio ispitanika pripada studentskoj populaciji 18-30 g (92,2 %), te najveći dio ispitanika živi na gradskom području (88 %). Pretežito prevladava najviša sveučilišna razina (71,3 %), a preostali dio ispitanika ima završenu srednju školu (28,7 %).

Tablica 4. Demografske karakteristike ispitanika (n=167)

Demografski podaci		n	%
Spol	Žene	140	83,8
	Muškarci	27	16,2
Dob	Studenska populacija (18-30g)	154	92,2
	Rana odrasla dob (30-40g)	4	2,4
	Srednja dob (40-60g)	7	4,2
	Kasna odrasla dob (>60g)	2	1,2
Obrazovanje	Osnovna škola	0	0
	Srednja škola	48	28,7
	Sveučilišna razina (fakultet)	119	71,3
Životno okruženje	Grad	147	88
	Selo	20	12
Ukupno		167	100

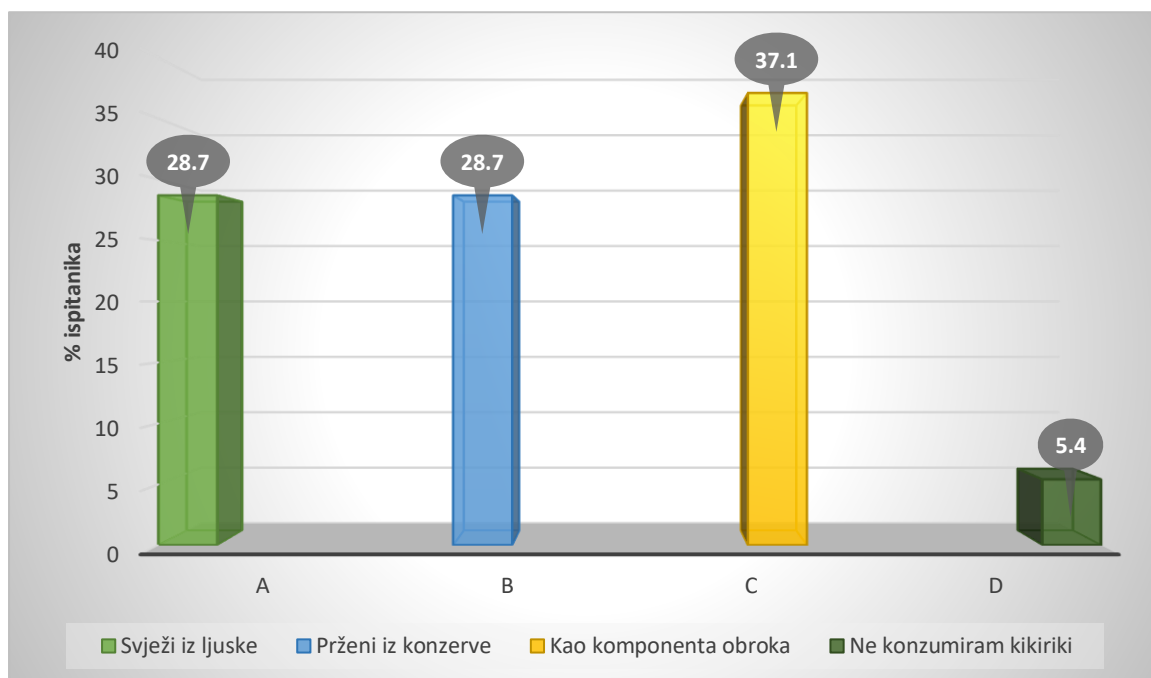
Na Slici 11 prikazani su odgovori ispitanika na pitanje *U koju skupinu namirnica se ubraja kikiriki*. Čak 77,8 % ispitanika je između ponuđenih odgovora izabralo odgovor da je kikiriki orašasti plod, dok se za ispravan odgovor da se kikiriki ubraja u skupinu mahunarki odlučilo 21 % ispitanika. Skupinu žitarica izabralo je 1,2 % ispitanika.



Slika 11. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *U koju skupinu namirnica se ubraja kikiriki*

Prema Uredbi (EU) br.1169/2011 kikiriki je naveden u zasebnoj skupini alergena „Kikiriki i proizvodi od kikirikija”, odvojeno od skupine orašastih plodova koji čine zasebnu skupinu alergena (Uredba, 2011). Proizvođači bi zajedno s potrošačima, trebali obratiti pažnju na ovu podjelu kako ne bi došlo do pogrešnih zaključaka tijekom pružanja informacija o hrani.

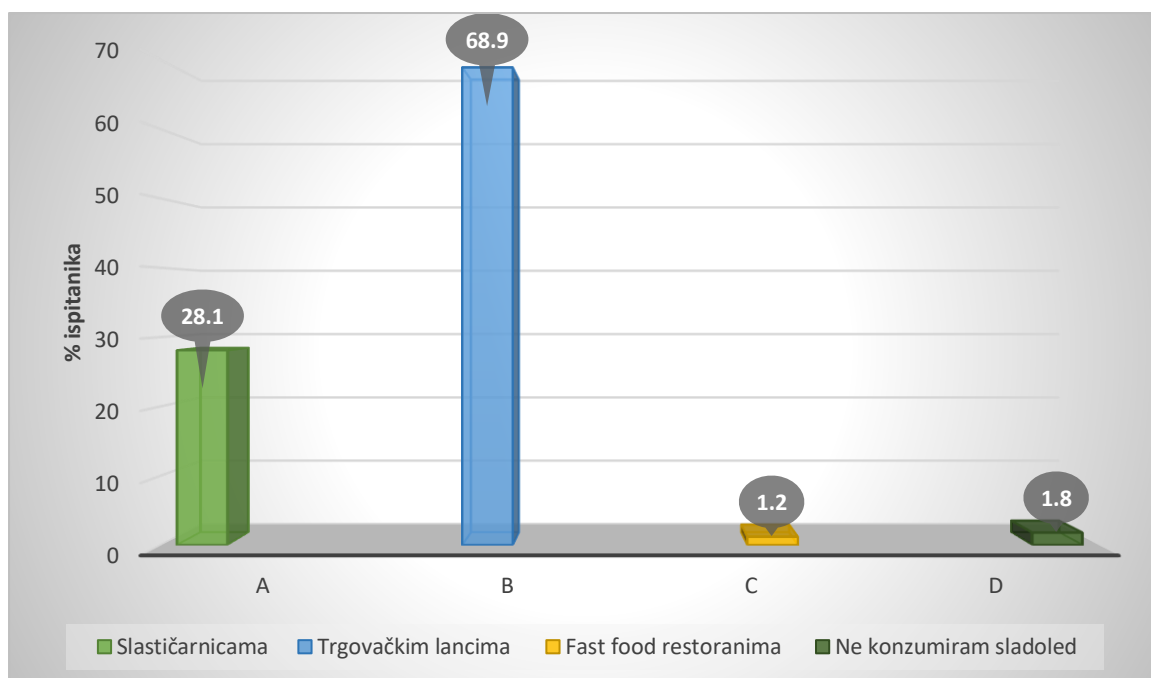
Na Slici 12 prikazani su odgovori na pitanje vezano uz načine konzumacije kikirikija. Najveći dio ispitanika konzumira kikiriki u okviru obroka (37,1 %), dok podjednaki broj ispitanika (28,7 %) konzumira kikiriki svježi iz ljuske ili prženi. Najmanji dio ispitanika (5,4 %) ne konzumira kikiriki ni u kojem obliku.



Slika 12. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *U kojem obliku najčešće konzumirate kikiriki*

Obzirom da najveći dio ispitanika konzumira kikiriki kao sastavni dio obroka, pojedinci koji imaju alergijske reakcije na kikiriki trebali bi pripaziti na konzumaciju kikirikija kao dijela obroka izvan kuće jer najveći dio alergijskih reakcija upravo se događa u određenim restoranima, slastičarnicama i pekarnicama (Furlong i sur., 2011).

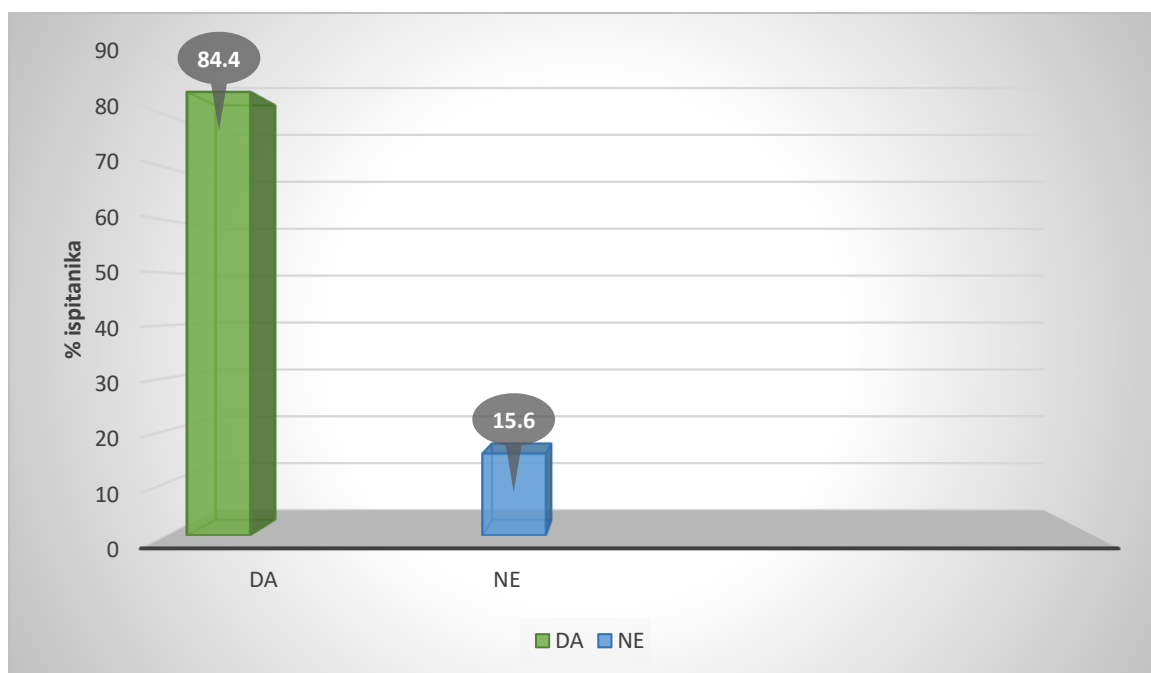
Kao što je vidljivo na Slici 13, najveći dio ispitanika (68,9 %) kupuje sladoled u trgovačkim lancima, dok 28,1 % ispitanika kupuje sladoled u slastičarnicama. Jedan dio ispitanika (1,8 %) ne konzumira sladoled, a najmanji dio ispitanika (1,2 %) kupuje sladoled u *fast food* restoranima.



Slika 13. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *Gdje najčešće kupujete sladoled*

SAD je najveći proizvođač sladoleda (6 bilijuna litara godišnje) uz prosječnu godišnju potrošnju od 22 L sladoleda po osobi, a jedino stanovnici Novog Zelanda bilježe višu godišnju potrošnju (26 L). Dvije trećine ukupnog prodanog sladoleda pripada slastičarnicama, restoranima i manjim prodajnim mjestima, jedna trećina velikim i malim trgovačkim lancima, a sladoled se najčešće konzumira izvan doma (Clarke, 2015).

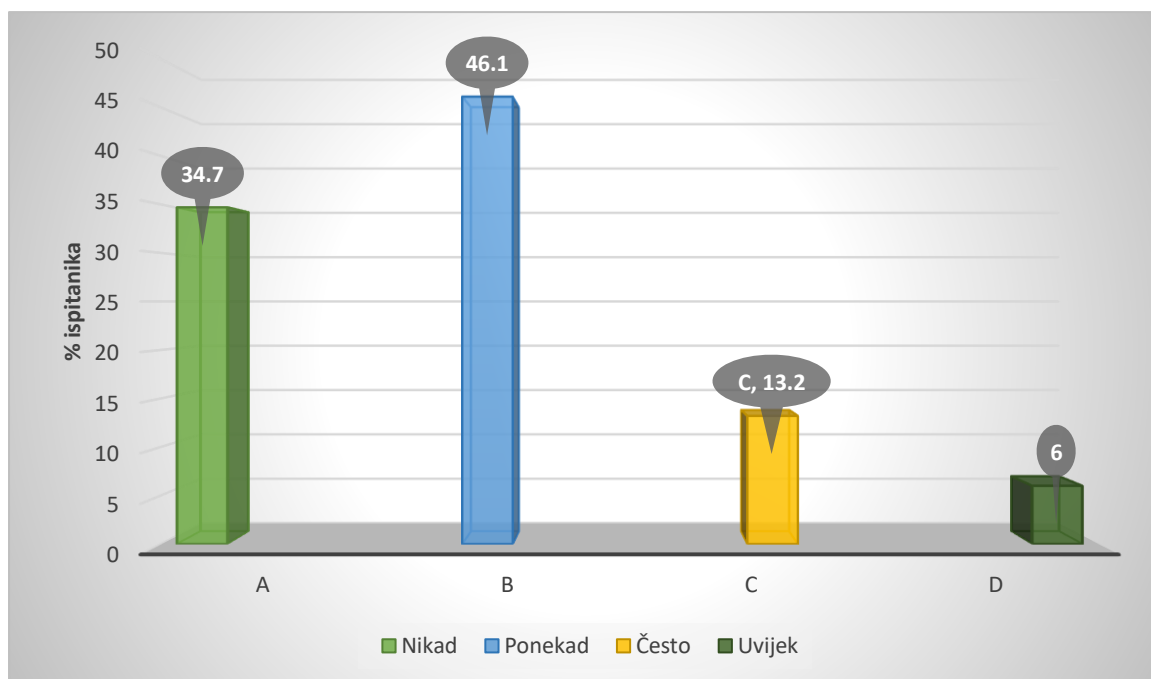
Na Slici 14 prikazani su odgovori ispitanika na pitanje smatraju li da sladoled može sadržavati tragove kikirikija ukoliko kikiriki nije jedan od sastojaka sladoleda. Veliki dio ispitanika (84,4 %) smatra da sladoled može sadržavati tragove kikirikija ukoliko kikiriki nije jedan od sastojaka sladoleda, dok mali dio ispitanika (16,6 %) smatra da sladoled ne može sadržavati tragove kikirikija.



Slika 14. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *Smatrate li da sladoled može sadržavati tragove kikirikija ukoliko kikiriki nije jedan od sastojaka sladoleda*

U praksi su zabilježeni slučajevi anafilaktičog šoka nakon konzumacije proizvoda koji nisu sadržavali kikiriki, a također ni savjetodavne oznake na tim proizvodima nisu upućivale na kikiriki. Razlog prisutnosti alergena kikirikija može biti proizvodnja na istoj proizvodnoj liniji kao proizvod koji sadrži kikiriki, odnosno pojava križne kontaminacije (Pape, 2009). U siječnju 2001. godine Američka uprava za hranu i lijekove provela je istraživanje prehrambenih tvrtki u kojima je pronađeno 25 % proizvoda s neprijavljenim alergenima, često zbog križne kontaminacije. Navodi poput „može sadržavati” su vjerojatno korisni, ali su oni zapravo slabo povezani s rizicima uslijed križne kontaminacije i zbog toga su prilično frustrirajući za mnoge potrošače. Analizirani su pozivi potrošača zbog alergijskih reakcija uslijed pogrešnih i loših savjetodavnih oznaka na proizvodima. U 24 mjeseca zabilježeno je 319 poziva. Najviše poziva bilo je vezano za mlijeko (84), kikiriki (60), orašaste plodove (31), itd. Najčešći prijavljeni problemi su bili: križna kontaminacija s neprijavljenim alergenom, vidljivi sastojci koji nisu opisani u savjetodavnim navodima, novo otkriveni alergeni koji nisu navedeni u savjetodavnim navodima, itd. Tvrtke su potvrdile pogrešku za čak 88 % prijavljenih problema (na primjer korištena ista oprema). Predloženo je da se koristi jednostavan jezik (na primjer umjesto pojma kazein trebao bi biti naveden pojam mlijeko), da se deklariraju alergeni ukoliko se nalaze u dodanim začinicima ili prirodnim aromama (Altschul i sur., 2001).

Iz grafičkog prikaza odgovora ispitanika na pitanje koliko često čitaju deklaraciju na proizvodima kao što je sladoled, prikazanih na Slici 15, vidljivo je da nešto manje od polovice ispitanika (46,1 %) ponekad čita deklaracije na sladoledima. 34,7 % ispitanika nikada ne čita deklaracije na sladoledima, dok često i uvijek čita najmanji dio ispitanika, odnosno 13,2 % te 6 % ispitanika.

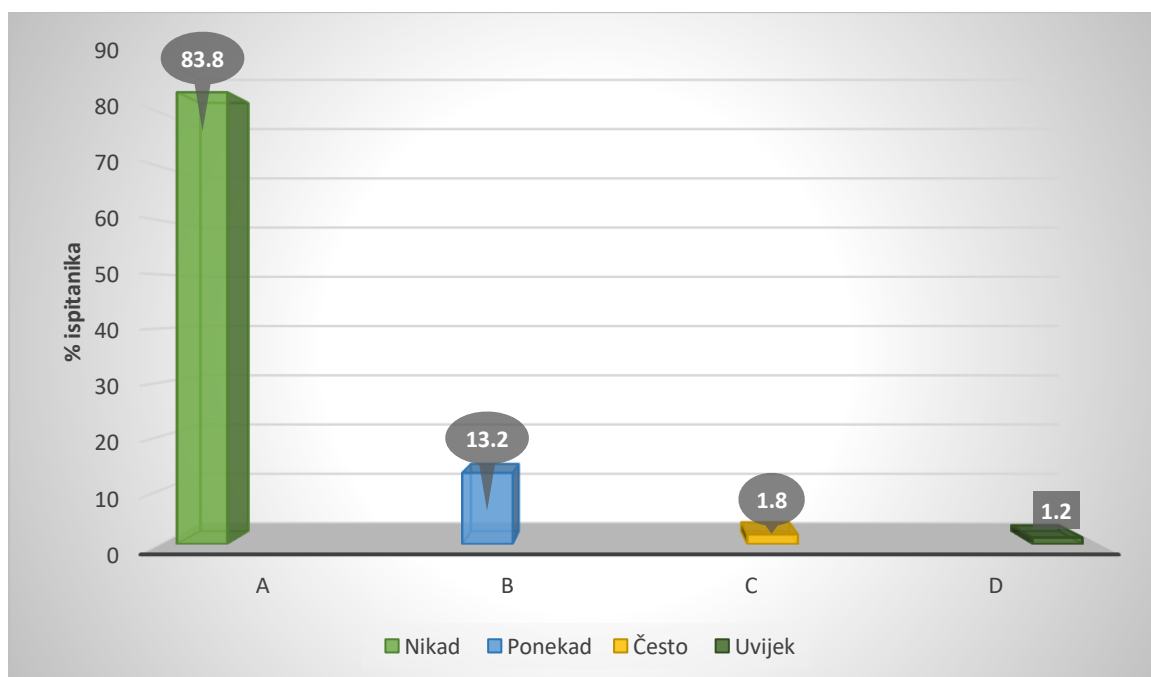


Slika 15. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *Koliko često čitate deklaraciju na proizvodu kao što je sladoled*

Hefle i suradnici (2007) proveli su anketu u kojoj su nastojali utvrditi da li potrošači s nutritivnim alergijama obraćaju pozornost na savjetodavne oznake o prisutnosti alergena kikirikija na proizvodima i da li proizvodi sa savjetodavnim oznakama sadržavaju prepoznatljive alergene kikirikija. U anketi je sudjelovalo 625 potrošača s nutritivnim alergijama tijekom 2003. godine i 645 potrošača s nutritivnim alergijama tijekom 2006. godine. Potrošači su manje obraćali pozornost na savjetodavne oznake na proizvodima (75 %) 2006. godine nego 2003. godine kada je 85 % potrošača obraćalo pozornost na savjetodavne oznake vezane uz alergene kikirikija u hrani. Bez obzira na nutritivne alergije koje imaju, potrošači su manje čitali savjetodavne oznake na proizvodima za koje su oni sami smatrali da ne sadrže sastojke na koje su alergični. Tragovi kikirikija pronađeni su u 20 od 200 pakiranih proizvoda koji na sebi imaju oznake o prisutnosti alergena kikirikija. Međutim, jedino u 13 proizvoda pronađene su klinički značajnije količine kikirikija (> 1mg kikirikija, >0,25 mg proteina kikirikija). Time rezultati pokazuju da većina proizvoda sa oznakom o prisutnosti alergena

kikirikija ne sadrže alergene kikirikija u proizvodu. Upravo zbog toga vidljiv je porast ignoriranja navoda o prisutnosti alergena od strane potrošača koji, uslijed pojačanih frustracija zbog prečestih korištenja navoda o alergenima od strane proizvođača, sve češće riskiraju i konzumiraju takve vrste proizvoda (Hefle i sur., 2007). Označavanje proizvoda navodima o prisutnosti alergena (npr. „može sadržavati” ili „proizvedeno u objektu koji prerađuje”) se koristi sve češće dobrovoljno, a proizvođači se na taj način žele zaštititi od mogućih alergijskih reakcija kod potrošača. Potrošači s nutritivnim alergijama sve češće zanemaruju te navode zbog frustracija i sumnji u njihov značaj. Kako bi se riješio taj problem potrebno je da proizvođači, industrija, regulativa i liječnici bolje utvrde rizike i pronađu bolji pristup tome problemu (Ford i sur., 2010).

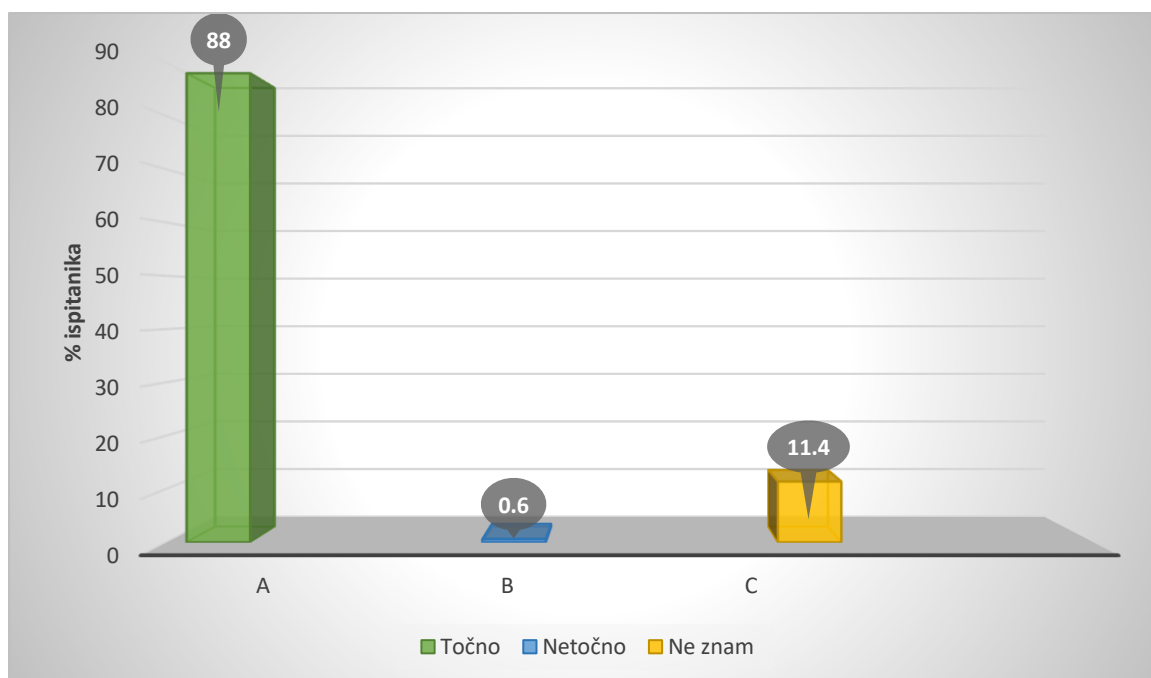
Na Slici 16 prikazani su odgovori ispitanika na pitanje koliko često se informiraju o sastojcima sladoleda kojeg kupuju, od strane zaposlenika u slastičarnici. Većina ispitanika (83,3 %) nikad ne pita zaposlenike vezano za sastojke u sladoledu dok ponekad pita samo 13,2 % ispitanika. Odgovore često i uvijek odabrao je mali dio ispitanika, 1,8 % odnosno 1,2 %. Slastičarnice kao subjekti u poslovanju s hranom imaju u ponudi nepretpakiranu hranu te su prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 obavezni informirati kupce o mogućoj prisutnosti alergena u hrani bilo usmenim ili pisanim putem (Uredba, 2011).



Slika 16. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *Koliko često se informirate o sastojcima sladoleda kojeg kupujete, od strane zaposlenika u slastičarnicama*

Ahuja i suradnici (2007) proveli su istraživanje u 100 restorana u New Yorku o znanju zaposlenika o alergenima u hrani, kako reagirati u slučaju alergijskih reakcija, te pružanja sigurnog obroka gostima. Istraživanje je provedeno uz pomoć ankete i telefonskog intervjua te je sudjelovalo 100 ispitanika (42 menadžera, 32 konobara, 24 šefa kuhinje i 2 pomoćne osobe). Istraživanje je obuhvaćalo talijanske, azijske i kontinentalne restorane, *fast food* restorane, slastičarnice i pekarnice. Samo 42 % ispitanika navelo je da je prisustovalo edukacijskom treningu o alergenima u hrani. Njih 72 % mogu omogućiti u potpunosti sigurno jelo gostima dok 70 % „jamče“ da bi mogli omogućiti sigurno jelo gostima. Samo 47 % smatra da bi moglo pravovremeno reagirati u slučaju alergijskih reakcija u hrani. U vezi pitanja o znanju zaposlenika, njih 24 % naznačilo je da je mala količina alergena sigurna za konzumaciju, 35 % vjeruju da prženjem odnosno toplinskom obradom mogu „uništiti“ alergene, 54 % smatra da su gosti sigurni ukoliko je postavljeni stol čist, a 25 % ispitanika smatra da izostavljanjem namirnica koje sadrže alergene (orašasti plodovi, jaja) sa završnog jela omogućavaju siguran obrok. Više od 80 % ispitanika prepoznaje kikiriki, morske plodove i mlijeko kao glavne alergene (61 % jaja). U praksi, njih 58 % je navelo da imaju siguran plan ako dođe do alergijske reakcije i njih 62 % imaju plan kako omogućiti siguran obrok. Njih 61 % je pokazalo interes za boljom edukacijom. U konačnici, anketirano osoblje restorana pokazalo je visoku razinu znanja obzirom na pružanje sigurnog jela osobi s alergijom, međutim postoje nedostaci u njihovoj razini znanja vezano uz alergene što ukazuje na potrebu za edukacijama i veću opreznost od strane potrošača (Ahuja i sur., 2007).

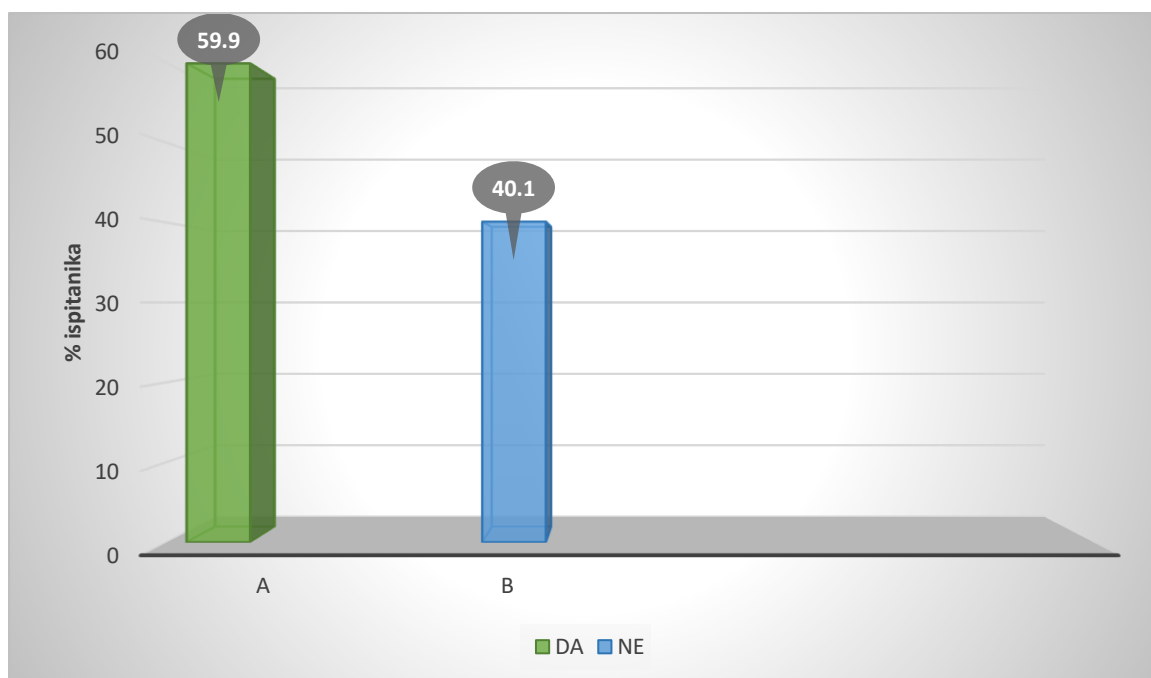
Na Slici 17 prikazani su odgovori ispitanika vezani uz pitanje da li postojeći propisi zahtijevaju da određene tvari ili proizvodi koji uzrokuju alergije moraju biti navedeni u popisu sastojaka. Većina ispitanika (88 %) smatra kako je navedena tvrdnja točna, dok 0,6 % ispitanika smatra kako je netočna, a 11,4 % ispitanika izabralo je odgovor *ne znam*.



Slika 17. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *Postojeći propisi zahtijevaju da određene tvari ili proizvodi koji uzrokuju alergije moraju biti navedeni u popisu sastojaka*

Označavanje određenih tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili netolerancije regulirano je prema Uredbi (EU) br.1169/2011. te oni moraju biti navedeni u popisu sastojaka (naziv tvari ili proizvoda), naglašeno uporabom vrste pisma koje se jasno razlikuje od vrste pisma kojim je pisan ostatak popisa sastojaka, na primjer različitim slovima, stilovima ili bojama u pozadini. Ako nema popisa sastojaka, navod podataka mora uključivati riječ „sadrži” iza koje se navodi naziv tvari ili proizvoda. Ako nekoliko sastojaka ili pomoćnih tvari u procesu proizvodnje hrane potječu od jedne tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili netolerancije, to je potrebno jasno navesti za svaki sastojak ili pomoćnu tvar u postupku proizvodnje (Uredba, 2011).

Odgovori ispitanika na pitanje *ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što je sladoled nema navoda o mogućoj prisutnosti kikirikija, smatraju li da taj proizvod ne sadrži tragove kikirikija*, prikazani su na Slici 18 59,9 % ispitanika izabralo je odgovor DA, a 40,1 % ispitanika odgovor NE.

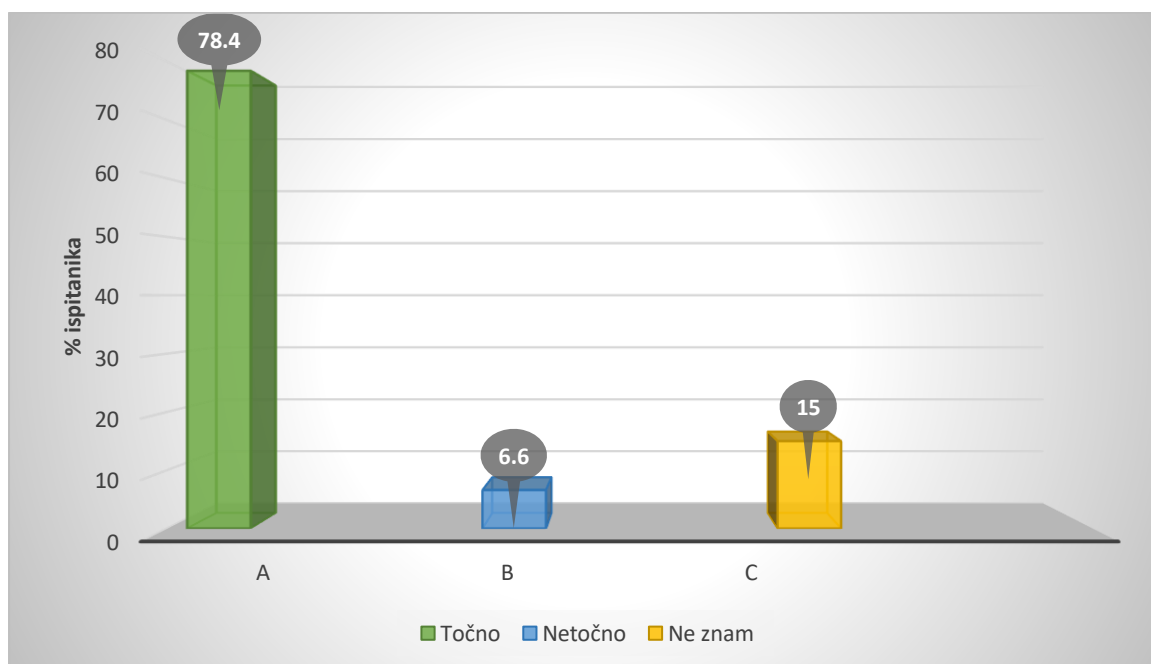


Slika 18. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *Ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što je sladoled nema navoda o mogućoj prisutnosti kikirikija, smatrate li da taj proizvod ne sadrži tragove kikirikija*

Ford i suradnici (2010) proveli su istraživanje koje istovremeno obuhvaća tri važna pitanja: učestalost i razinu kontaminacije proizvoda sa savjetodavnim navodima koji sadrže tri glavna alergena (jaja, mlijeko i kikiriki), utvrditi da li stupanj rizika za navedene alergene varira između malih i velikih proizvođača te odrediti učestalost i razinu kontaminacije proizvoda bez savjetodavnih navoda. Prikladni uzorci prikupljeni su iz mnoštva trgovina na području New Yorka i New Jerseyja. Prikupljeno je 100 proizvoda sa ili bez savjetodavnih navoda o alergenima koji su sadržavali tri alergena: kikiriki, jaja i mlijeko. Rezultati kontaminacije prema kategoriji proizvoda bili su: smjese za pečenje (5/80), čokolade (4/68), nečokoladne slastice koje sadrže kikiriki (2/11), keksi (6/85), slane grickalice (2/81), žitarice (0/59), tjestenine (0/15) i smjese za palačinke (0/2). Općenito, razina kontaminacije bila je veća od 10 ppm u 12 od 19 tih proizvoda. S obzirom na veličinu posluživanja, kontaminacija alergenima jaja iznosila je 0,084 do 0,26 g, kontaminacija alergenima mlijeka iznosila je 0,13 do 7,3 mg i kontaminacija alergenima kikirikija iznosila je 0,17 do 5,8 mg po serviranju. Kikiriki je najčešće detektiran u proizvodima sa savjetodavnim navodima o prisutnosti alergena kikirikija,. Alergeni mlijeka češće su detektirani kod malih proizvođača. Detektirani su tragovi alergena u 5,3 % proizvoda sa savjetodavnim oznakama te u 1,9 % sličnih proizvoda bez savjetodavnih oznaka. Kod malih proizvođača razina kontaminacije iznosila 5,1 %, a kod velikih proizvođača

0,75 %. Ova saznanja pokazuju pravi rizik za potrošače i ističu da je potrebno probuditi svijest kod proizvođača, osobito manjih. 4,5 % proizvoda sa savjetodavnim navodom pokazivali su mjerljive količine alergena kikirikija, ali prema procjeni rizika obzirom na veličinu serviranja samo bi jedan od pet proizvoda prelazio graničnu vrijednost. U konačnici, istraživanje je pokazalo da bi potrošači s nutritivnim alergijama trebali izbjegavati proizvode sa savjetodavnim oznaka jer predstavljaju potencijalni rizik za potrošače. Potrošači moraju biti oprezni prema proizvodima bez savjetodavnih oznaka, a osobito kod manjih proizvođača te prema onima koji se ubrajaju u kategoriju proizvoda većeg rizika (Ford i sur., 2010).

Na Slici 19 prikazani su odgovori ispitanika na pitanje vezano uz obvezu oznaka poput „može sadržavati tragove kikirikija” ili „ovaj proizvod je proizveden na opremi koja je bila u doticaju s orašastim plodovima”. Čak 78,4 % ispitanika smatra da je obveza navedenih oznaka točna, 6,6 % netočna, a 15 % ispitanika je izabralo odgovor *ne znam*.

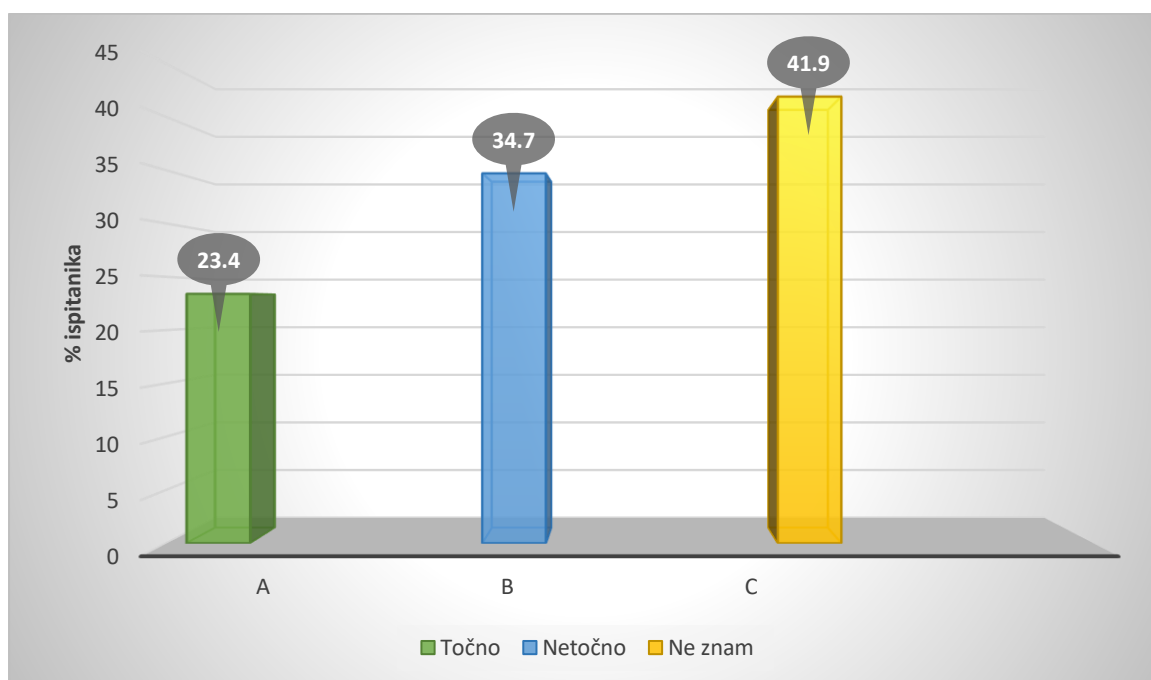


Slika 19. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *Oznake poput „može sadržavati tragove kikirikija” ili „ovaj proizvod je proizveden na opremi koja je bila u doticaju s orašastim plodovima” su obavezne*

Zbog straha od skrivenih alergena potrošači s nutritivnim alergijama sve više traže informacije o korištenju zajedničke opreme i objekata tijekom proizvodnje. Kao odgovor na to, prehrambena industrija počela je dobrovoljno koristiti dodatne informacije kao savjetodavne oznake na proizvodima (Hefle i sur., 2007). Najčešće dodatne informacije na savjetodavnim

oznakama su: „može sadržavati (alergen)“, „proizvedeno na zajedničkoj opremi sa (alergen)“ i „proizvedeni u istom objektu s (alergen)“. U prehrambenoj industriji znatno se povećala svijest o opasnosti od alergijskih reakcija. Hrana se može kontaminirati ostacima alergena na više različitih mjesta u proizvodnom lancu uključujući berbu, skladištenje, prijevoz i proces proizvodnje. Na istoj opremi mogu se proizvesti različiti proizvodi, neki mogu sadržavati alergene proizvode dok drugi ne. Mnoge tvrtke se trude pravilno očistiti uređaje između različitih proizvodnih linija međutim to nije ujednačeno kod svih tvrtki i učinkovitost nije jednaka (Brough i sur., 2015).

Na Slici 20 prikazani su odgovori ispitanika na pitanje o postojanju jedinstvenog podatka o minimalnoj količini kikirikija koja može izazvati alergijsku reakciju, te je vidljivo kako 23,4 % ispitanika smatra kako je točno da taj podatak postoji, 34,7 % ispitanika smatra kako je netočno da taj podatak postoji, a 41,9 % ispitanika izabralo je odgovor *ne znam*.



Slika 20. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=167) na pitanje *Postoji jedinstveni podatak o minimalnoj količini kikirikija koja može izazvati alergijsku reakciju*

U današnje vrijeme, novija istraživanja mogu doprinjeti utvrđivanju referentnih vrijednosti za pojedine alergene u hrani (Ballmer-Weber i sur., 2015), iako općenito količine alergena koje mogu izazvati alergijske reakcije nisu jasno utvrđene u literaturi (Ford i sur., 2010). Taylor i suradnici (2002) nastojali su odrediti da li je kvaliteta i količina postojećih kliničkih podataka za česte alergene namirnice dovoljna da se omogući postizanje jednoglasno suglasne odluke o

utvrđivanju količine alergena u određenoj hrani koja može izazvati alergijsku reakciju. U rujnu 1999. sazvan je okrugli stol sa 12 kliničkih alergologa i ostalih zainteresiranih kako bi razmjenili postojeće podatke o i raspravljali o kliničkom pristupu kojim bi stekli te informacije. Pomoću kliničkih podataka pokušali su identificirati specifične vrijednosti za kikiriki, kravlje mlijeko i jaja dok su za ostalu hranu poput ribe i senfa podaci bili vrlo ograničeni. Obzirom da su ti specifični podaci dobiveni raznim protokolima bilo je vrlo teško, za određene alergene, odrediti količine koje mogu izazvati alergijsku reakciju, odnosno blage simptome kod najosjetljivijih osoba. Postoje individualne razlike kod osoba s istom vrstom alergije na određenu hranu. Vrijednosti za različite alergene (kikiriki i jaja) ne moraju biti nužno jednake. Jedno od kliničkih ispitivanja za kikiriki provedeno je uz pomoć jednostuko ili dvostruko slijepog testa i otvorenog testa. Sudjelovalo je 306 pacijenata iz klinike u Francuskoj. Najniža količina iznosila je 1 mg kikirikija kod četiri pacijenta, a za sve pacijente vrijednosti su se kretale od 1 mg do 5 g. Ispitanici su konzumirali mljeveni kikiriki, maslac od kikirikija ili brašno od kikirikija. Rezultati su prikazani kao miligram proteina kikirikija ili kikirikija. U slučaju kikirikija, postoje brojne individualne razlike, a moguće razlike u proteinima kikirikija ovise i o samoj sorti kikirikija i o agronomskim uvjetima uzgoja (Taylor i sur., 2002).

Hourihane i suradnici (1997) proveli su dvostruko slijepi test na 14 izabranih ispitanika koji su prethodno reagirali na proteine kikirikija iz sirovog kikirikijevog ulja. Korištene su količine od 10 µg do 50 mg proteina kikirikija iz komercijalnog kikirikijevog brašna. Rezultati su pokazali sustavnu reakciju na 5 mg proteina kikirikija kod jedne osobe, a dva sudionika imala su objektivne reakcije na 2 mg i 50 mg. Pet sudionika imalo je blago subjektivne reakcije na 1 do 5 mg i 4 do 50 mg dok preostalih 5 sudionika nije imalo nikakvu reakciju do 50 mg proteina kikirikija. Svi sudionici s uvjerljivim objektivnim reakcijama imali su kratkotrajne subjektivne reakcije na prethodne količine, u dva slučaja čak niže od 100 µg. Čak i u grupi dobro karakteriziranih osjetljivih osoba na kikiriki, prag osjetljivosti je jako različit te najmanja količina od 100 µg može izazvati alergijsku reakciju (Hourihane i sur., 1997).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju prikazanih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Alergeni kikirikija detektirani su u petnaest od ukupno devetnaest uzoraka sladoleda iz slastičarnica, a informacije o hrani analiziranih nepretpakiranih uzoraka sladoleda nisu sadržavale informacije vezane uz prisutnost alergena kikirikija.

2. Između dvadeset analiziranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca, alergeni kikirikija detektirani su kod njih dvanaest. Dobiveni analitički podaci podudaraju se sa informacijama o hrani vezanim uz prisutnost alergena kikirikija u slučaju dvanaest analiziranih zapakiranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca ("ST₁", "ST₂", "ST₃", "ST₄", "ST₉", "ST₁₀", "ST₁₁", "ST₁₂", "ST₁₅", "ST₁₈", "ST₁₉", "ST₂₀").

3. Rezultati imunoenzimskih analiza devetnaest uzoraka sladoleda iz slastičarnica pokazuju da se udio alergena kikirikija kreće u rasponu od 0,12 mg kg⁻¹ ("SS₁₆") do 12,22 mg kg⁻¹ ("SS₁₂"), a prosječno iznosi 1,53 mg kg⁻¹. Udio alergena kikirikija u dvadeset analiziranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca kreće se u rasponu od 0,20 mg kg⁻¹ ("ST₂₀") do 5,44 mg kg⁻¹ ("ST₁₂"), te prosječno iznosi 1,06 mg kg⁻¹.

4. Većina ispitanika (84,4 %) smatra da sladoled može sadržavati tragove kikirikija ukoliko kikiriki nije jedan od sastojaka sladoleda. Obzirom na dodatne navode o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija, 40,1 % ispitanika smatra da proizvod kao što je sladoled sadrži tragove kikirikija ukoliko na deklaraciji nema dodatnog navoda o njegovoj mogućoj prisutnosti.

5. Rezultati određivanja alergena kikirikija imunoenzimskom ELISA metodom, dobiveni tijekom ovog istraživanja, podudaraju se sa informacijama o hrani kod četiri od devetnaest analiziranih nepretpakiranih uzoraka sladoleda iz slastičarnica, te dvanaest od dvadeset analiziranih zapakiranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca.

6. LITERATURA

Ahuja, R., Sicherer, S. H. (2007) Food allergy management from the perspective of restaurant and food establishment personnel. *Annals of Allergy, Asthma & Im.* **98**, 344–348.

Altschul, A.S., Scherrer, D.L., Muñoz-Furlong, A., Sicherer, S.H. (2001) Manufacturing and labeling issues for commercial products: Relevance to food allergy. *J. Allergy Clin. Immun. Letters to the Editor*, 468.

Anonymous 1 (2011) < <http://erpi-nurdin-scientist-laboratory.blogspot.com/2011/12/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa.html> > Pristupljeno 11. kolovoza 2019.

Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, **72**, 4–15.

Ballmer-Weber, B.K., Fernandez-Rivas, M., Beyer, K., Defernez, M., Sperrin, M., Mackie, A.R., Salt, L.J., O'B. Hourihane, J., Asero, R., Belohlavkova, S., Kowalski, M., de Blay, F., Papadopoulos, N.G., Clausen, M., Knulst, A.C., Roberts, G., Popov, T., Sprickelman, A.B., Mills, E.N.C. (2015) How much is too much? Threshold dose distributions for 5 food allergens. *J. Allergy Clin. Immun.* **135**, 964-971.

Benjamini, E., Leskowitz, S. (1991) Immunology: a short course. 2.izd., Wiley-Liss, New York, str. 459.

Besler, M. (2001) Determination of allergens in foods. *TrAC Trends in Anal. Chem.* **20**, 662–672.

Besler, M., Kasel, U., Wichmann G. (2002) Review: Determination of Hidden Allergens in Foods by Immunoassays. *Internet Symposium on Food Allergens*, **4**, 1 – 18.

Beyer., K., Morrow, E., Li, X.M., Bardina, L., Bannon, G.A., Burks, A.W., Sampson, H.A. (2001) Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin. Immun.* **107**, 1077–1081.

Bock, S.A.(1987) Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics*, **79**, 683-638.

Bock, S.A., Munoz-Furlong A., Sampson, H.A. (2001) Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immun.* **107**, 191–193.

Bohle, B. (2004) T lymphocytes and food allergy. *Mol. Nutr. Food Res.* **48**, 424–433.

Bousquet, J., Bjorksten, B., Brujnzeel-Koomen, C., Huggett, A., Ortolani, C., Warner, J.O., Smith, M. (1998) Scientific criteria and selection of allergenic foods for labeling. *Allergy*, **53**, 3-21.

Brough, H.A., Turner, P.J., Wright, T., Fox, A.T., Taylor, S.L., Warner, J.O., & Lack, G. (2015). Dietary management of peanut and tree nut allergy: what exactly should patients avoid? *Clin. Exp. Allergy*, **45**, 859–871.

Burks, A. W., Sampson, H. A., Bannon, G. A. (1998) Peanut allergens. *Allergy*, **53**, 725–773.

Burks, W., Lehrer, S.B., Bannon, G.A. (2004) New approaches for treatment of peanut allergy: chances for a cure. *Clin. Rev. Allerg. Immu.* **27**, 191–196.

Burks, W., Sampson, H.A., Bannon, G.A. (2008). Peanut allergens. *Allergy*, **53**,725–730.

Bush, R. K., Hefle, S. L. (1996) Food allergens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**, 119–163.

Brujnzeel-Koomen, C., Ortolani, C., Aas, K., Bindslev-Jensen, C., Bjoerksten, B., Wuethrich, B. (1995) Adverse reaction to food. *Allergy*, **50**, 623-635.

Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruškar, M., Rimac Brnčić, S., Bačun Družina V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croat. J. of Food Tech. Biotech. and Nutr.* **8**, 90 – 101.

Car, H. (2017) Egzotično voće kroz brojke: Kikiriki-voće, povrće ili nešto treće? *Matka* **25**, **100**, 232-233.

Clarke, C. (2015) The science of ice cream, 2. izd., RSC Publishing, UK.

- Chen, J., Xia, L., Wu, X., Yang, S., Ji, K., Liu, Z., Gao, C. (2012) A practical test system for sensitive, rapid screening and authentication of peanut allergens in imported and exported food products in Chinese Customs. *Food Control*, **23**, 154–158.
- Chu, R.S., Targoni, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V., Harding, C.V. (1997) CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.* **186**, 1623–1631.
- Chung, S.Y., Champagne, E.T. (2001) Association of end-product adducts with increased IgE binding of roasted peanuts. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3911–3916.
- De Vries, J.E., Gauchat, J.F., Aversa, G.G., Punnonen, J., Gascan, H., Yssel, H. (1991) Regulation of IgE synthesis by cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 851–858.
- Emmett, S.E., Angus, F.J., Fry, J.S., Lee, P.N. (1999) Perceived prevalence of peanut allergy in Great Britain and its association with other atopic conditions and with peanut allergy in other household members. *Allergy*, **54**, 380–385.
- Ford, L.S., Taylor, S.L., Pacenza, R., Niemann, L.M., Lambrecht, D.M., Sicherer, S.H. (2010) Food allergen advisory labeling and product contamination with egg, milk, and peanut. *J. Allergy Clin. Immun.* **126**, 384–385.
- Freeman, A.K., Morris, N. J., Willich, R. K. (1954) Peanut butter, U.S. Dept. of Agriculture Bulletin AIC, str. 370.
- Furlong, T. J., DeSimonea, J., Sicherer, S. H. (2001) Peanut and tree nut allergic reactions in restaurants and other food establishments. *J. Allergy Clin. Immun.* **108**, 867–870.
- Gendel, S. M. (2012) Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regul. Toxicol. and Pharma.* **63**, 279–285.
- Gupta, R., Springsten, E., Warriar, M., Smith, B., Kumar, R., Pongracic, J., Holl, J., (2011) The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*, **128**, 9–17.
- Harlow, E., Lane, D. (1999) Using antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Hefle, S.L. (2006) Methods for detecting peanuts in food. U: Detecting allergens in food (Koppelman, S.J., Hefle, S.L., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 185-200.
- Hefle, S.L, Furlong, T.J., Niemann, L., Lemon-Mule, H., Sicherer, S., Taylor, S.L. (2007) Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts. *J. Allergy Clin. Immun.* **120**, 171-176.
- Holzhauser, T., Vieths, S. (1999) Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (*Arachis hypogaea L*) protein in complex food matrices. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 603-611.
- Hong, S.J., Michael, J.G., Fehringer, A., Leung, D.Y. (1999) Pepsin-digested peanut contains T-cell epitopes but no IgE epitopes. *J. Allergy Clin. Immun.* **104**, 473-478.
- Hourihane, J. O., Kilburn, S. A., Nordlee, J. A., Hefle, S. L., Taylor, S. L., Warner, J. O. (1997) An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: A randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J. Allergy Clin. Immun.* **100**, 596-600.
- Hourihane, J.O., Roberts, S.A., Warner, J.O.(1998) Resolution of peanut allergy: case-control study. *BMJ.* **316**, 1271-1275.
- Hourihane, J.O. (2002) Recent advances in peanut allergy. *Curr. Opin. Allergy Cl. Immun.* **2**, 227-231.
- Ji, K., Chen, J., Li, M., Liu, Z., Wang, C., Zhan, Z. (2009) Anaphylactic shock and lethal anaphylaxis caused by food consumption in China. *Trends in Food Sci. & Techn.* **20**, 227-231.
- Kang, I.H., Gallo, M. (2007) Cloning and characterization of a novel peanut allergen Ara h 3 isoform displaying potentially decreased allergenicity. *Plant Science*, **172**, 345-353.
- Kanny, G., Moneret-Vautrin, D. A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., Thevenin, F. (2001) Population study of food allergy in France. *J. Allergy Clin. Immun.* **108**, 133-140.
- Kay, A.B. (2001) Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **344**, 30-37.

Koppelman, S.J., Bleeker-Marcelis, H., Duijn, G., Hessing, M. (1996) Detecting peanut allergens. The development of an immunochemical assay for peanut proteins. *World of Ingredients*, **12**, 35–38.

Koppelman, S. J., Bruijnzeel-Koomen, C., Hessing, M., De Jongh, H. H. J. (1999) Heat-induced Conformational Changes of Ara h 1, a Major Peanut Allergen, Do Not Affect Its Allergenic Properties. *J. of Biol. Chem.* **274**, 4770–4777.

Koppelman, S. J., Vlooswijk, R. A. A., Knippels, L. M. J., Hessing, M., Knol, E. F., Van Reijssen, F. C., Bruijnzeel-Koomen, C. (2001) Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different part of the world. *Allergy*, **56**, 132–137.

Koppelman, S.J., Hefle, S.L. (2006) Detecting allergens in food, Woodhead Publishing, Cambridge.

Krska, R., Welzig, E., Baumgartner, S. (2004) Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 63–65.

Lehrer, S.B., Horner, W.E., Reese, G. (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**, 553–564.

Lehrer, S.B., Ayuso, R., Reese, G. (2002) Current understanding of food allergens. *Ann NY Acad. Sci.* **964**, 69–85.

Lemke, P.J., Taylor, S.L. (1994) Allergic reactions and food intolerances. U: Nutritional Toxicology (Kotsonis, F.N., Mackey, M., Hjelle, J., ured.), Raven Press, N.Y. str. 117-137.

Li, X.M., Zhang, T.F., Huang, C.K., Srivastava, K., Teper, A.A., Zhang, L., Schofield, B.H., Sampson, H.A. (2001) Food Allergy Herbal Formula-1 (FAHF-1) blocks peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *J. Allergy Clin. Immun.* **108**, 639–646.

Li, X.M. (2005) Beyond allergen avoidance: update on developing therapies for peanut allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immun.* **5**, 287–292.

Madsen, C. (2001) Where are we in risk assessment of food allergens? The regulatory view. *Allergy* **56**, 91–93.

Maleki, S. J., Viquez, O., Jacks, T., Dodo, H., Champagne, E. T., Chung, S.-Y., Landry, S. J. (2003) The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J. Allergy Clin. Immun.* **112**, 190–195.

Merz, B. (2003) Studying peanut anaphylaxis. *N. Engl. J. Med.* **348**, 975–976.

Mikita, C. P., Padlan, E. A. (2012) Can we explain the allergenicity of peanuts on the basis of the three-dimensional structure of its allergens and use the information to devise means of eliminating peanut allergy? *Med. Hypotheses*, **79**, 585–591.

Ministarstvo poljoprivrede (2015) Vodič za informiranje potrošača o nepretpakiranoj hrani, <https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages/dokumenti/hrana/vodici/Vodic_za_informiranje_potrosaca_o_nepretpakiranoj_hrani_2015.pdf>. Pristupljeno 15.kolovoza 2019.

Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M.F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R.M., Wal, J.M., Bernard, H. (2005) Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4547–4553.

Moneret-Vautrin, D.A., Rance, F., Kanny, G., Olsewski, A., Gueant, J.L., Dutau, G., Guerin, L. (1998) Food allergy to peanuts in France—evaluation of 142 observations. *Clin. Exp. Allergy*, **28**, 1113–1119.

Mustorp, S., Engdahl-Axelsson, C., Svensson, U., Holck, A. (2007) Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR. *Eur. Food Res. and Technol.* **226**, 771–778.

Nowak-Wegrzyn, A., Sampson, H.A. (2004) Food allergy therapy. *Immun. Allergy Clin. North. Am.* **24**, 705–725.

Osborne, N., Koplin, J.J., Martin, P.E., Gurrin, L.C., Lowe, A.J., Matheson, M.C., Ponsonby, A.-L., Wake, M., Tang, M.L.K., Dharmage, S.C., Allen, K.J., (2011) Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using populationbased sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J. Allergy Clin. Immun.* **127**, 668–676.

- Pape, S. B. (2009) "May Contain" Labelling: Adequate Consumer Warning or Unnecessarily Defensive Manufacturer Behaviour? *J. of Consum. Policy*, **32**, 165–188.
- Pele, M., Brohee, M., Anklam, E., Van Hengel, A.J. (2007) Peanut and hazelnut traces in cookies and chocolates: relationship between analytical results and declaration of food allergens on product labels. *Food Addit. Contam.* **24**, 1334–1344.
- Petersen, A., Becker, W., Jappe, U. (2013) What makes peanuts so allergenic? *J. Serbian Chem. Soc.* **78**, 321-331.
- Pomés, A., Helm, R. M., Bannon, G. A., Burks, A. W., Tsay, A., Chapman, M. D. (2003) Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *J. Allergy Clin. Immun.* **111**, 640–645.
- Poms, R.E., Klein, C.L., Anklam, E. (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.*, **21**, 1–31.
- Puhač Bogadi N. (2016) Upravljanje alergenima u prehrambenoj industriji. Crolab. str. 1 – 15 <https://www.crolab.hr/userfiles/file/KAL/Puha_Bogadi_Upravljanje_alergenima_u_prehrambenoj_industriji.pdf>. Pristupljeno 17.kolovoza 2019.
- Romagnani, S. (1991) Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol. Today*, **12**, 256–257.
- Sampson, H.A., McCaskill, C.C. (1985) 'Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients'. *J. Pediatr.* **107**, 669–675.
- Sampson, H.A. (1990) 'Food allergy'. *Curr. Opin. Immunol.* **2**, 542–547.
- Sampson, H.A. (1991) 'Immunologic mechanisms in adverse reactions to foods', *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **11**, 701–716.
- Sampson, H.A., Mendelson, L., Rosen, J.P. (1992) Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N. Engl. J. Med.* **327**, 380–384.
- Sampson, H.A., Ho, D.G. (1997) Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J. Allergy Clin. Immun.* **100**, 444–451.

Sampson, H. A. (1999). Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin. Immun.* **103**, 717–728.

Sampson, H.A. (2000) What should we be doing for children with peanut allergy? *J. Pediatr.* **137**, 741–743.

Sampson, H.A. (2001) Immunological approaches to the treatment of food allergy. *Pediatr. Allergy Immu.* **12**, 91–96.

Sampson, H.A. (2002) Clinical practice-peanut allergy. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1294-1299.

Sampson, H.A. (2004) Update on food allergy. *J. of Allergy and Clin. Immun.* **113**, 805-819.

Sicherer, S.H., Munoz-Furlong, A., Burks, A.W., Sampson, H.A. (1999) Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States of America determined by a random digit dial telephone survey. *J. Allergy Clin. Immun.* **103**, 559-562.

Sicherer, S.H., Sampson, H.A. (2007) Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *J. Allergy Clin. Immun.* **120**, 491-503.

Sicherer, S. (2011) Epidemiology of food allergy. *J. Allergy Clin. Immun.* **127**, 594–602.

Skolnick, H.S., Conover-Walker, M.K., Koerner, C.B., Sampson, H.A., Burks, W., Wood, R.A. (2001) The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immun.* **107**, 367–374.

Spanjersberg M. Q. I., Knulst A. C., Kruizinga A. G., Van Duijn G., Houben G. F. (2010) Concentrations of undeclared allergens in food products can reach levels that are relevant for public health. *Food Addit. and Contam.* **27**, 169 – 174.

Spiegelberg, H.L., Orozco, E.M., Roman, M., Raz, E. (1997) DNA immunization: a novel approach to allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, **52**, 964–970.

Spergel, J.M., Fiedler, J.M. (2001) Natural history of peanut allergy. *Curr. Opin. Pediatr.* **13**, 517– 522.

Stanley, J.S., King, N., Burks, A.W., Huang, S.K., Sampson, H., Cockrell, G., Helm, R.M., West, C.M., Bannon, G.A. (1997) Identification and mutational analysis of the

immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut allergen Ara h2. *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 244–253.

Strober, W. (1986) 'Gluten-sensitive enteropathy: a nonallergic immune hypersensitivity of the gastrointestinal tract', *J. Allergy Clin. Immun.* **78**, 202–211.

Suhr, M., Wicklein, D., Lepp, U., Becker, W.-M. (2004) Isolation and characterization of natural Ara h 6: Evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat. *Mol. Nutr. & Food Res.* **48**, 390–399.

Taylor, S.L., Hefle, S.L. (2000) Hidden triggers of adverse reactions to foods. *Can. J. Allergy Clin. Immun.* **5**, 106–110.

Taylor, S.L., Hefle, S.L. (2001) Food allergies and other food sensitivities. *Food Technol.* **55**, 68-83.

Taylor, S. L., Hefle, S. L., Bindslev-Jensen, C., Bock, S. A., Burks, A. W., Christie, L., Zeiger, R. S. (2002) Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: How much is too much? *J. Allergy Clin. Immun.* **109**, 24–30.

Taylor, S.L., Hefle, S.L. (2005) Allergen control. *Food Technol.* **59**, 40-43.

Taylor, S. (2006) The nature of food allergy. U: Detecting allergens in food, (Koppelman, S.J., Hefle, S.L., ured.), Woodhead Publishing Ltd, Abington, str. 3-20.

Uredba (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani (2011) *Službeni list* Europske Unije.

Van Hengel, A. J. (2007) Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal. and Bioanal. Chem.* **389**, 111–118.

Warner, J.O. (2005) European food labeling legislation – a nightmare for food manufacturers and allergy sufferers alike. *Pediatr. Allergy Immu.* **16**, 1–2.

Wen, H.-W., Borejsza-Wysocki, W., DeCory, T. R., Durst, R. A. (2007) Peanut Allergy, Peanut Allergens, and Methods for the Detection of Peanut Contamination in Food Products. *Compr. Rev. in Food Sci. and Food Safety*, **6**, 47–58.

Wensing, M., Penninks, A.H., Hefle, S.L., Koppelman, S.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Knulst, A.C. (2002) The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immun.* **110**, 915-920.

Whitaker, T.B., Williams, K.M., Trucksess, M.W., Slate, A.B. (2005) Immunochemical analytical methods for the determination of peanut proteins in foods. *J. AOAC Int.* **88**, 161–174.
Wraith, D.C., Smilek, D.E., Mitchell, D.J., Steinman, L., Mcdevitt, H.O. (1989) Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. *Cell*, **59**, 247–55.

Yeung, J. (2006) Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in foods. U: Detecting allergens in food (Koppelman, S.J., Hefle, S.L., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 109-124.

Zagon, J., Dittmer, J., Elegbede, C. F., Papadopoulos, A., Braeuning, A., Crépet, A., Lampen, A. (2015) Peanut traces in packaged food products consumed by allergic individuals: Results of the MIRABEL project. *J. Food Compos. Anal.* **44**, 196–204.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vidaković Helena

Ime I prezime studenta