

Imunoenzimska metoda u određivanju alergena kikirikija

Ćurić, Adriana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:391073>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

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



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Nutricionizam

Adriana Ćurić

7096/N

**IMUNOENZIMSKA METODA U ODREĐIVANJU
ALERGENA KIKIRIKIJA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitika hrane

Mentor: prof. dr. sc. *Ksenija Marković*

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Imunoenzimska metoda u određivanju alergena kikirikija
Adriana Ćurić, 0119022756

Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti udio potencijalnih alergena kikirikija imunoenzimskom ELISA metodom (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) u 8 uzoraka sladoleda od čokolade, odnosno četiri uzorka sladoleda iz različitih slastičarnica te četiri uzorka sladoleda različitih proizvođača iz trgovačkih lanaca. Analitički rezultati uspoređeni su s navodima u okviru informacija o hrani vezanim uz prisustvo alergena. U sedam od ukupno osam analiziranih uzoraka sladoleda, detektirani su alergeni kikirikija. Raspon unutar kojeg se kretao udio alergena kikirikija u analiziranim uzorcima sladoleda od čokolade iz slastičarnica iznosi od 0,27 do 0,62 mgkg⁻¹, dok se u uzorcima sladoleda iz trgovačkih lanaca udio kretao u rasponu od 0,12 do 0,35 mgkg⁻¹. Najviši udio alergena kikirikija određen je u uzorku "SS4" iz slastičarnice te iznosi 0,62 mgkg⁻¹, pri čemu je u okviru informacija o hrani naveden sadržaj alergena među kojima nije istaknut kikiriki.

Ključne riječi: alergeni, imunoenzimska metoda, kikiriki, sladoled

Rad sadrži: 31 stranicu, 12 slika, 5 tablica, 38 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Marković

Datum obrane: 9. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Peanut allergen detection using immunoenzyme method
Adriana Ćurić, 0119022756

Abstract:

The purpose of this study was to determine the content of potential peanut allergens by using the immunoenzyme ELISA method (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) in eight samples of chocolate ice cream, from which four of samples were from different pastry shops, and the other four were ice creams of different manufacturers from a retail chains. The analytical results were compared with the food information claims related to the presence of allergens. Peanut allergens were detected in seven out of eight analysed samples. In samples of chocolate ice cream from pastry shops, the range of determined peanut allergens was from 0,27 to 0,62 mgkg⁻¹, and in samples from a retail chains from 0,12 to 0,35 mgkg⁻¹. The highest content of peanut allergens was 0,62 mgkg⁻¹ and it was determined in a sample from a pastry shop "SS4" which contained an advisory label related to the presence of allergens, but didn't contain a claim related to the presence of peanut.

Keywords: allergens, immunoenzyme method, ice cream, peanut

Thesis contains: 31 page, 12 figures, 5 tables, 38 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD. Ksenija Marković, Full Professor

Defence date: July 9th 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ALERGIJE NA HRANU	2
2.1.1. Prevalencija alergija na hranu.....	3
2.2. ALERGENI U HRANI	5
2.3. ALERGIJA NA KIKIRIKI	6
2.3.1. Alergeni kikirikija	7
2.3.2. Utjecaj toplinske obrade na alergenost namirnice.....	8
2.4. ALERGENI I ZAKONSKA REGULATIVA	9
2.4.1. Informiranje potrošača o sadržaju alergena u hrani	10
2.4.2. Navodi vezani uz prisustvo alergena.....	10
2.5. METODE ZA ODREĐIVANJE ALERGENIH SASTOJAKA HRANE	11
2.5.1. ELISA metoda u određivanju alergena.....	11
2.5.2. Vrste ELISA testa.....	12
2.5.2.1. "Sendvič" ELISA.....	13
2.5.2.2. Konkurentna ELISA	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJAL.....	15
3.1.1. Uzorci.....	15
3.1.2. Laboratorijska oprema i pribor	15
3.1.3. Reagensi.....	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Priprema otopina reagensa.....	19

3.2.2.	Ekstrakcija uzoraka.....	19
3.2.3.	Analiza uzoraka ELISA testom.....	19
3.2.3.1.	Princip određivanja	19
3.2.3.2.	Postupak određivanja	20
3.2.4.	Obrada podataka.....	22
4.	REZULTATI I RASPRAVA	23
5.	ZAKLJUČAK.....	27
6.	LITERATURA	28

1. UVOD

Alergija na hranu je imunološki posredovana reakcija organizma koja se opetovano pojavljuje nakon izlaganja određenom alergenu hrane (Moore i sur., 2017). Osim alergijskih reakcija, nerijetko su prisutne i reakcije intolerancije na hranu koje se razlikuju od alergija time što nisu posredovane imunološkim sustavom i najčešće se javljaju zbog nedostatka određenog enzima (Turkalj i Mrkić, 2012).

Prevalencija alergija na hranu je u posljednjih desetljeća u porastu i postaje značajan problem javnog zdravstva (Turkalj i Mrkić, 2012) zbog čega se sve više u kontinuitetu radi na pronalasku sigurnog i prikladnog liječenja. Međutim, trenutno je za osobe s alergijskom preosjetljivosti najsigurniji način za prevenciju alergijske reakcije upravo izbjegavanje hrane koja sadrži određeni alergen. Iz tog razloga, alergije na hranu često imaju negativan utjecaj na kvalitetu života preosjetljive osobe povećavajući troškove i ograničavajući izbor hrane (Barros i Cosme, 2013).

Sladoled je prehrambeni proizvod u kojem se nerijetko koristi kikiriki kao sirovina za proizvodnju, ali je i čest slučaj da alergeni kikirikija slučajno dospiju u sladoled putem unakrsne kontaminacije tijekom procesa proizvodnje. Zato se danas koriste brojne metode prikladne za detektiranje potencijalnih alergena u hrani koje omogućavaju proizvođačima usklađivanje proizvoda s deklaracijom. Tako one postaju važnim sredstvom kojim se potrošačima osiguravaju ispravne informacije o hrani i prisustvu mogućih skrivenih alergena (Montserrat i sur., 2015; Van Hengel, 2007). Takve metode trebaju biti visoko osjetljive, specifične i brze, te je poželjno da njihovo izvođenje bude jednostavno (Chen i sur., 2012). Jedna takva metoda je našla svoju primjenu u prehrambenoj industriji i vrlo često se koristi za detekciju alergena kikirikija u hrani. Radi se o imunoenzimskoj ELISA metodi (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) koja se temelji na principu specifičnog vezanja antitijela i ispitivanog antigena (Pomés i sur., 2002).

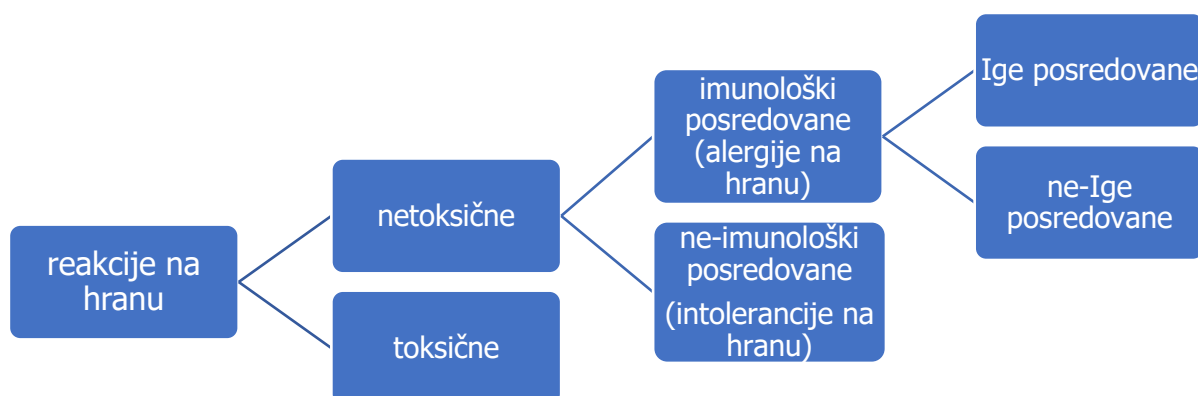
Cilj ovog rada bit će, koristeći imunoenzimsku ELISA metodu, odrediti udio potencijalnih alergena kikirikija u osam uzoraka sladoleda od čokolade od čega u četiri uzorka sladoleda iz različitih slastičarnica te četiri uzorka sladoleda različitih proizvođača iz trgovačkih lanaca. Rezultati imunoenzimskih analiza usporedit će se s navodima u okviru informacija o hrani vezanim uz prisustvo alergena.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALERGIJE NA HRANU

Nepoželjne reakcije na hranu mogu se podijeliti na toksične i netoksične. Toksične reakcije javljaju se kao posljedica konzumacije određene količine hrane kontaminirane bakterijama ili toksinima. Netoksične reakcije se odnose na reakcije preosjetljivosti na hranu koje mogu biti imunološki posredovane i tada govorimo o alergijama na hranu, dok s druge strane, ne-imunološki posredovane reakcije se vežu uz pojam intolerancije (Bruijnzeel-Kommen i sur., 1995). Intolerancija nema veze s alergijom jer nije uključena imunološka reakcija antigen-antitijelo i pojavljuje se zbog urođenih enzimskih defekata. Primjer za intoleranciju, odnosno nealergijsku preosjetljivost je laktoza intolerancija gdje se u nedostatku enzima laktaze ne može probaviti mliječni šećer laktoza i osobe s tim defektom bi trebale izbjegavati namirnice iz skupine mlijeka i mliječnih proizvoda.

Alergija na hranu odgovor je imunološkog sustava u kojem dolazi do preosjetljivosti na pojedine komponente hrane, najčešće na proteine (Hong i sur., 2009; Turkalj i Mrkić, 2012). Taj odgovor najčešće uključuje proizvodnju imunoglobulina-E (IgE – antitijela) specifičnog za pojedini antigen, dok u ostalim slučajevima, u mehanizmu alergijske reakcije ne sudjeluje imunoglobulin-E (Jackson, 2003). Tako se IgE posredovana alergijska reakcija smatra ranom ili neposrednom jer se simptomi javljaju unutar nekoliko minuta do nekoliko sati od ingestije i najčešće su respiratorne ili kožne prirode. S druge strane, kod ne-IgE posredovane reakcije govorimo o kasnoj ili odgođenoj alergijskoj reakciji gdje se kliničke manifestacije očituju nekoliko sati do nekoliko dana od izlaganja alergenima hrane, te se pretežito radi o gastrointestinalnim simptomima (Sampson, 1999; Kolaček, 2011). Slika 1 shematski prikazuje podjelu reakcija na hranu.



Slika 1. Podjela reakcija na hranu (Heine, 2015)

Istraživanja su pokazala da postoji genetska predispozicija i da kod osoba koje su predisponirane dolazi do jače ekspresije karakterističnih dijelova genoma ili pojedinih gena koji reguliraju sintezu tvari odgovornih za simptome alergijske reakcije (Martinis, 2004). Međutim, točni molekularni mehanizmi djelovanja još su predmet istraživanja. Osim toga, postoji tvrdnja da djelovanje gena pojačavaju okolišni čimbenici, pa je tako porast prevalencije alergijskih reakcija na hranu rezultat zajedničkog djelovanja gena i okolišnih čimbenika kao što su način prehrane, priprema namirnica te kulturoloških i socijalnih čimbenika svojstvenih pojedinim zemljama i kulturama (Hong i sur., 2009; Turkalj i Mrkić, 2012).

2.1.1. Prevalencija alergija na hranu

Alergijske su reakcije na hranu, poput ostalih alergijskih bolesti, zadnjih desetljeća u porastu posebice u razvijenim zemljama Zapada. Podatci govore da je čak 2 % odrasle svjetske populacije razvilo alergijsku preosjetljivost na pojedine komponente hrane (Sampson, 1999). Mogu se javiti u svakoj životnoj dobi posebice kod osoba koje već imaju sklonost alergijama na druge supstance, tzv. osobe atopične konstitucije. Tijekom životne dobi se mijenjaju, kao i alergeni koji ju izazivaju, s tim da se zbog još nedovoljne zrelosti imunološkog sustava najčešće javljaju u dječjoj dobi. Učestalost pojave u djece mlađe od 3 godine je 6 do 8 %, te se najčešće javlja alergija na bjelancevine kravljeg mlijeka. Do pete godine života čak 80 % djece razvije toleranciju, dok se kod alergije na kikiriki tolerancija tijekom odrastanja razvije u samo 20 % djece (Turkalj i Mrkić, 2012) (Tablica 1).

Tablica 1. Prevalencija alergijskih reakcija na hranu u djece i odraslih te razvoj tolerancije (Turkalj i Mrkić, 2012)

Hrana	Djeca (mlađa od 6 godina)	Odrasli	Razvoj tolerancije
Mlijeko	2,5 %	0,3 %	80 %
Jaja	1,3 %	0,2 %	60-70 %
Kikiriki	0,8 %	0,6 %	20 %
Orašidi	0,2 %	0,5 %	Ne
Riba	0,1 %	0,4 %	Ne
Školjke	0,1 %	2 %	Ne
Ostalo	6 %	3,7 %	-

2.2. ALERGENI U HRANI

Iako ljudska prehrana obuhvaća vrlo širok spektar namirnica, samo dio njih može uzrokovati alergijsku reakciju. Nutritivni alergeni se smatraju antigenima koji su po kemijskom sastavu proteini ili tvari vezane na proteine – hapteni. Hapteni su najčešće životinjskog, ali mogu biti i bilnog podrijetla. Tvari koje uzrokuju alergijsku reakciju su proteini, polisaharidi i lipidi od kojih jedni mogu izazvati veću, a drugi manje intenzivnu reakciju kod preosjetljivih osoba. Proteini i polisaharidi su jači alergeni i uzrokuju jaču alergijsku reakciju od lipida. Također, postoji mogućnost da kod određenih prehrambenih skupina, posebno kod orašastih plodova i školjki, alergija na jednu namirnicu iz skupine rezultira alergijom na druge namirnice iz iste skupine. Ta se pojava naziva unakrsna alergija (Martinis, 2004). Najznačajniji alergeni u hrani koji se svrstavaju u 11 skupina nalaze se u tablici 2.

Tablica 2. Najznačajniji alergeni u hrani (Hrvatska agencija za hranu, 2009)

1.	Žitarice koje sadrže gluten i njihovi proizvodi
2.	Ribe, rakovi, školjke i ostali mekušci te njihovi proizvodi
3.	Jaja i proizvodi od jaja
4.	Kikiriki i orašasto voće
5.	Soja i proizvodi od soje
6.	Mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući i laktozu)
7.	Celer
8.	Gorušica
9.	Lupina/vučji bob
10.	Sjeme sezama
11.	Sumporni dioksid (SO ₂) i sulfiti

Međutim, noviji podatci donose porast broja slučajeva alergija na hranu koja dosad nije smatrana značajnim alergenom, što dokazuje da bilo koja namirnica može uzrokovati

alergijsku reakciju. Tako se danas, osim na navedene alergene može javiti i alergija na svinjetinu, govedinu, riječnu ribu, rižu koja se inače smatra zamjenskom hranom za osobe s alergijama na hranu, određeno povrće, voće te kakao i kavu (Hrvatska agencija za hranu, 2009).

2.3. ALERGIJA NA KIKIRIKI

Kikiriki (lat. *Arachis Hypogea*) ubraja se u porodicu mahunarki čiji se plodovi nalaze zaštićeni unutar ljuske te rastu i razvijaju se ispod zemlje (Levetin i McMahon, 2008). Za čovjeka, pa čak i za životinje predstavlja hranu visoke nutritivne vrijednosti jer sadrži visok udio masti ali i proteina od kojih su mnogi snažni alergeni.

Uz navedene alergenske namirnice koje mogu izazvati alergijsku preosjetljivost, kikiriki obično uzrokuje ozbiljne i teške posljedice uključujući i po život opasnu anafilaksiju (Pomés i sur., 2002). Neke osobe mogu imati snažne reakcije prilikom izlaganja manjim količinama alergena, dok se s druge strane preosjetljivost kod nekih pojedinaca može javiti nakon izlaganja mnogo većim dozama (Jackson, 2003). U tom slučaju, udio proteina kikirikija u rasponu od čak 0,1 do 1000 mg može izazvati imunološki odgovor u preosjetljivih osoba (Chen i sur., 2012). Najučinkovitiji način sprječavanja pojave moguće alergijske reakcije na kikiriki je izbjegavanje njegova konzumiranja, kao i hrane koja ga sadrži. Međutim, tijekom proizvodnje vrlo često dolazi do unakrsne kontaminacije prehrambenih proizvoda pa je ostatke kikirikija u hrani teško isključiti. Upravo se nutritivno označavanje hrane i prehrambenih proizvoda smatra učinkovitom metodom kojom se potrošači i osobe s alergijskom preosjetljivošću na kikiriki upozoravaju na prisutnost kikirikija u proizvodima i njegovih tragova u istima. Tako se u većini slučajeva uspješno sprječava moguća alergijska reakcija uslijed konzumiranja kikirikija i proizvoda koji ga sadrže (Chen i sur., 2012). Za osobe s alergijskom preosjetljivošću na kikiriki najrizičnija hrana su slastičarski proizvodi, sladoledi i smrznuti deserti, preljevi za salate i razni umaci, čokoladni slatkiši, maslac od badema i lješnjaka, razna orijentalna jela, ulje od kikirikija i kikiriki maslac (Hrvatska agencija za hranu, 2009).

Do izlaganja kikirikiju može doći:

- konzumiranjem hrane koja sadrži kikiriki
- konzumiranjem hrane koja u sebi sadrži kikiriki kao posljedica nenamjerne kontaminacije tijekom proizvodnog procesa

- udisanjem prašine ili aerosola koji u sebi sadrže kikiriki (brašno ili ulje kikirikija) (Hrvatska agencija za hranu, 2009).

Istraživanja su pokazala da alergiju na kikiriki ima čak 0,8 % adolescenata i 0,6 % odrasle populacije u SAD-u (Chen i sur., 2012). Najčešće se javlja već tijekom prvih godina života i u 80 % oboljele populacije zadržava se do kraja života (Hrvatska agencija za hranu, 2009).

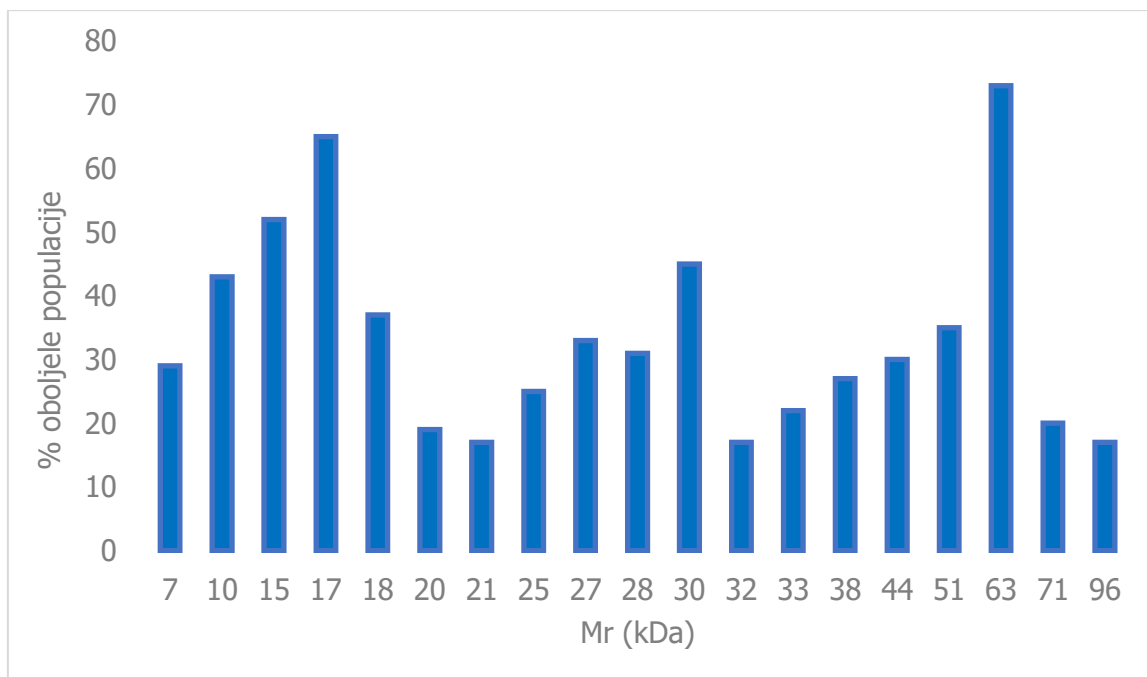
2.3.1. Alergeni kikirikija

Reakcija preosjetljivosti na kikiriki je imunološki posredovana i uključuje interakciju IgE antitijela i specifičnog antigena. Antigeni koji konzumacijom kikirikija uzrokuju alergijsku reakciju su njegovi proteini i istraživanja su pokazala da su IgE antitijela specifična ne samo za jedan, nego čak za veći broj proteina kikirikija (Clarke i sur., 1998). Od velikog broja proteina kikirikija koji mogu djelovati kao alergeni treba izdvojiti Ara h 1, Ara h 2 i Ara h 3 koji su smješteni u sjemenu biljke. U tablici 3 se nalaze molekulske mase tri glavna alergena kikirikija, procijenjene pomoću metode SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) (Burks i sur., 1998).

Tablica 3. Procijenjene molekulske mase alergena kikirikija (Burks i sur., 1998)

Alergen	Molekulska masa (kDa)
Ara h 1	65
Ara h 2	17
Ara h 3	14

Od navedenih, obzirom na svoju molekulsku masu Ara h 1 i Ara h 2 su prepoznati od strane IgE antitijela u 70-90 % oboljelih osoba, dok je manji dio populacije pokazao preosjetljivost na Ara h 3. Istraživanja su pokazala da kod oboljelih pojedinaca specifičnost IgE antitijela za različite proteine kikirikija rezultira simptomima različite jačine (Flintermann i sur., 2007). Slika 2 prikazuje postotak pojedinaca s alergijskom preosjetljivošću na pojedine proteine kikirikija.



Slika 2. Postotak pojedinaca s alergijskom preosjetljivosti na pojedine proteine kikirikija (Clarke i sur., 1998)

2.3.2. Utjecaj toplinske obrade na alergenost namirnice

Kikiriki se ovisno o kulinarскоj tradiciji i kulturi često podvrgava različitim vrstama termičke obrade. Osim kikirikija u ljusci, na tržištu najčešće nalazimo prženi ili pečeni, ali može se naći čak i kuhani kikiriki koji je karakterističan za područje Kine (Palladino i Breiteneder, 2018). Ovisno o načinu obrade, tijekom toplinskog procesiranja kikirikija i namirnica koje ga sadrže može doći do promjena na molekularnoj razini. S jedne strane dolazi do uklanjanja epitopa i smanjenja alergenosti namirnice, dok s druge strane termička obrada može dovesti i do nastajanja alergena koji nisu bili prisutni u sirovoj hrani (Jackson, 2003). Neka istraživanja su pokazala da pečenjem ili prženjem kikirikija dolazi do reakcije između amino skupine alergena i reducirajućih šećera, odnosno tzv. Maillardove reakcije pri čemu nastaju završni produkti glikozilacije koji mogu uzrokovati alergijsku reakciju. Istraživanja pokazuju da su ti produkti nastali u prisutnosti reducirajućih šećera i djelovanjem visoke temperature na protein kikirikija, lecitin, koji inače nema alergena svojstva. Upravo je ta reakcija zaslužna za to da proteini prženog kikirikija jače vežu IgE antitijela i snažnije inhibiraju vezanje drugih proteina, povećavajući tako alergenost namirnice (Burks, 2008). Nasuprot tome, kuhanjem kikirikija vjerojatno dolazi do prijelaza proteina u vodu i u tom slučaju alergeni Ara h 1, Ara h 2 i Ara h 3 u manjoj mjeri vežu IgE antitijela i smanjuje se alergenost namirnice (Palladino i Breiteneder, 2018).

2.4. ALERGENI I ZAKONSKA REGULATIVA

Označavanje hrane predstavlja jedan od najsloženijih zakonski uređenih područja vezanih uz hranu i ima ključnu ulogu u komunikaciji s potrošačima (Panjkota Krbavčić i sur., 2017). Označavanje na deklaraciji pruža potrošaču sve potrebne informacije o hrani na osnovu kojih on donosi odluku o odabiru proizvoda prema svojim prehrambenim potrebama, a između ostalog se odnosi na određena upozorenja vezana uz samu prirodu hrane i opasnosti na zdravlje pojedinca koje se mogu javiti njezinom konzumacijom. Upravo pružanje informacija o prisutnosti alergena i tvari koje izazivaju intoleranciju, na pretpakiranoj hrani, hrani iz automata i nepretpakiranoj hrani (catering, kantina, bolnica, dječji vrtić, restoran javne prehrane i sl.) koja se nudi krajnjem potrošaču pripada ovim upozorenjima (Katalenić, 2007).

Pružanje potrošačima potrebnih informacija o hrani i prehrambenim proizvodima uređeno je od strane Europskog parlamenta i Vijeća Europske unije u sklopu Uredbe (EU) br. 1169/2011 koja je objavljena 22. studenog 2011. godine, a u Hrvatskoj je na snazi od 13. prosinca 2014. godine (Uredba EU, 2011).

Kako bi se postigla visoka razina zaštite potrošača i zajamčilo njihovo pravo na informacije, potrebno ih je primjereno informirati u vezi s hranom koju konzumiraju. Tako bi informacije o hrani, osim putem etiketa, trebale biti dostupne potrošačima i putem nekog drugog popratnog materijala, uključujući sredstva moderne tehnologije ili verbalne komunikacije. Sve informacije o hrani bi trebale slijediti praksu poštenog informiranja i moraju biti točne, jasne, lako razumljive te ne smiju obmanjivati potrošača (Uredba EU, 2011).

Ukoliko se tvari koje mogu uzrokovati alergije i intolerancije kod nekih osoba koriste kao pomoćni sastojci u proizvodnji hrane ili njihova prisutnost proizlazi iz vrste i naziva proizvoda, one izravno predstavljaju opasnost za zdravlje te skupine potrošača. U tom ih je slučaju nužno navesti na deklaraciji i ubrajaju se u informacije o hrani koje su obvezne prema regulativi (Uredba EU, 2011). S druge strane, tijekom tehnološkog procesa može doći do nenamjerne kontaminacije prehrambenog proizvoda i on u konačnici može sadržavati tragove alergena (Van Hengel, 2007). Takve informacije o mogućoj i nenamjernoj prisutnosti u hrani tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili intoleranciju pripadaju dobrovoljnim informacijama o hrani i subjekt u poslovanju hranom ih pruža svojevrijedno. Informacije o hrani koje se navode dobrovoljno ne smiju zauzimati prostor namijenjen obveznim informacijama o hrani (Uredba EU, 2011).

2.4.1. Informiranje potrošača o sadržaju alergena u hrani

Za pružanje informacija o hrani treba razmotriti sve načine opskrbe potrošača hranom. Osim pretpakirane hrane, na kojoj se informacije moraju nalaziti u sklopu ambalaže ili etikete koja je za nju pričvršćena, postoji i nepretpakirana hrana koja uključuje primjerice obroke koji se poslužuju u restoranima, hranu koja se dostavlja kućama, hranu koja se pakira na mjestu prodaje u minimalno zaštitno pakiranje, npr. kruh, sendviči, kolači, ili napitci bez originalne ambalaže kao što su pića koja se poslužuju natočena u čaše ili šalice. Upravo je navođenje prisutnosti alergena iz tog razloga nešto složenije kod nepretpakirane hrane. U tim slučajevima kada se informacije ne nalaze u neposrednoj blizini hrane, bilo na etiketi uz hranu ili na jelovnicima, pločama i sl., postoji i opcija vidljive obavijesti kojom se potrošači pozivaju da se za informacije o prisustvu tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili intolerancije obrate osoblju (Ministarstvo poljoprivrede, 2015).

2.4.2. Navodi vezani uz prisustvo alergena

Informacije koje upućuju na prisustvo tvari koje uzrokuju alergije ili intolerancije na hranu i koje se nalaze na samoj ambalaži ili u neposrednoj blizini hrane moraju biti lako uočljive, jasno čitljive, i prema potrebi, neizbrisive kako bi se omogućilo potrošačima da budu informirani i da bi mogli donijeti odluke koje su sigurne za njih (Uredba EU, 2011). U tim slučajevima koriste se navodi poput "sadrži alergeni sastojak", "bez alergena" ili "može sadržavati". U slučaju navoda "bez alergena" se izričito negira postojanje nekog alergena u proizvodu. On može biti upitan i dovesti u opasnost jer uvjerava potrošača da alergene tvari nema, dok se najčešće u analitičkom smislu ona ne može detektirati odgovarajućim metodama. Navod "može sadržavati" upućuje potrošača na mogući rizik prilikom konzumacije proizvoda i ubraja se u neobavezne informacije o hrani jer ih proizvođač pruža dobrovoljno (Katalenić, 2007). Temelji se na činjenici da proizvođač ne može jamčiti da proizvod nije kontaminiran alergenima budući da se u istim objektima proizvode i skladište različiti prehrambeni proizvodi. Takav način označavanja može nepotrebno dovesti potrošača u zabludu u vezi sa sadržajem alergena u samom proizvodu, ali s druge strane štiti zdravlje potrošača koji imaju neku alergiju ili intoleranciju (Van Hengel, 2007; Katalenić, 2007).

Upravo zajedničko djelovanje zakonodavnih tijela i prehrambene industrije postaje neizostavno u prenošenju ispravnih informacija potrošaču o sadržaju alergenih sastojaka u proizvodima i omogućuje bolje upravljanje alergenima u konačnici (Van Hengel, 2007).

2.5. METODE ZA ODREĐIVANJE ALERGENIH SASTOJAKA HRANE

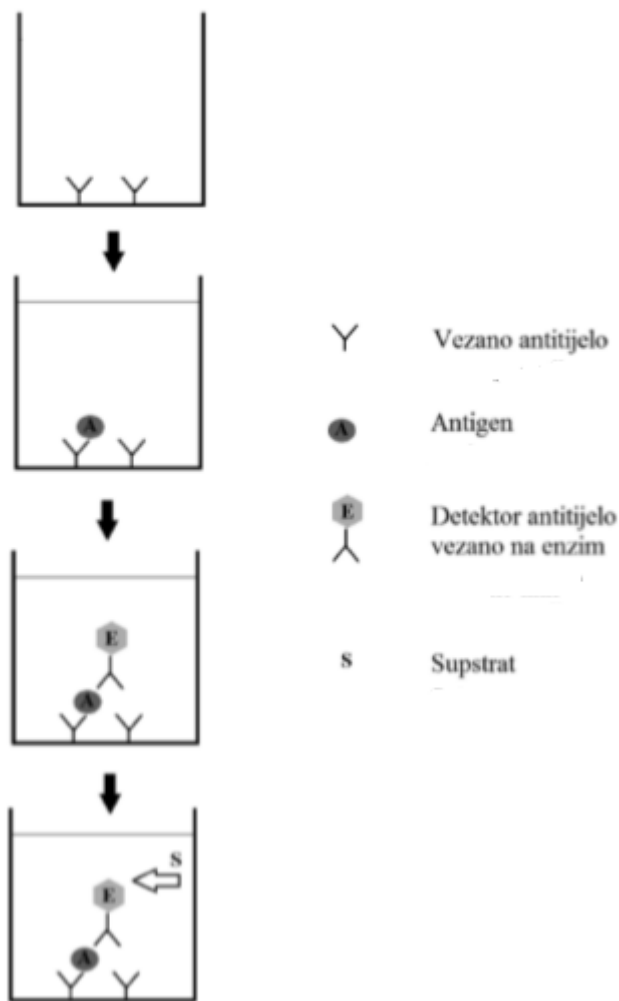
U Europskoj uniji, kontrole koje se bave sigurnošću hrane prema zakonskim propisima obavljaju provjeru hrane prije njezine isporuke na tržište (Butorac i sur., 2013). Kako bi se osiguralo poštivanje zakonskih akata vezanih uz označavanje alergena i tako bolje zaštitili potrošači, zahtijevaju se pouzdane metode određivanja alergeni sastojaka u hrani (Montserrat i sur., 2015). Odabir odgovarajuće metode za određivanje alergena uvjetovan je s više čimbenika kao što su: jednostavnost, točnost, preciznost, ponovljivost, granica detekcije i kvantifikacije, radno područje i selektivnost. U današnje vrijeme široko su rasprostranjene biokemijske metode koje prate imunoenzijske reakcije pri detekciji određenog sastojka (Butorac i sur., 2013; Montserrat i sur., 2015).

2.5.1. ELISA metoda u određivanju alergena

Imunoenzijski ELISA test (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) je imunološka metoda koja se temelji na svojstvu antitijela da specifično veže antigen ili haptan iz uzorka, te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije do koje dolazi zbog promjene boje (Butorac i sur., 2013). Ova metoda je vrlo osjetljiva, daje brze i pouzdane rezultate a zahtijeva utrošak malih količina antigena i antitijela. Svoju primjenu je našla u kvalitativnom i kvantitativnom određivanju.

Uvođenju ELISA-e u istraživanja prethodilo je otkriće da se topljivi antigen ili antitijela mogu vezati na čvrstu podlogu a da se ne isperu puferskom otopinom. U tu svrhu se rabe polistirenske mikrotitarske ploče četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica. U samom postupku antigen ili antitijela su označeni nekim enzimom, najčešće peroksidazom, a reakcija se očitava prema promjeni boje supstrata što ga enzim razgrađuje. Očitavanje se vrši mjerenjem apsorbancije na spektrofotometru (Cvrtila i Runje, 2006). Slika 3 shematski

prikazuje tijek imunoenzimske ELISA metode.



Slika 3. Imunoenzimski test ELISA (Butorac i sur., 2013)

Svoju primjenu našla je u prehrambenoj industriji gdje se koristi za određivanje alergena u hrani kao što su kikiriki, lješnjaci, bademi i jaja, ali i za kontaminaciju hrane mikroorganizmima, pesticidima i antibioticima (Butorac i sur., 2013; Pomés i sur., 2002).

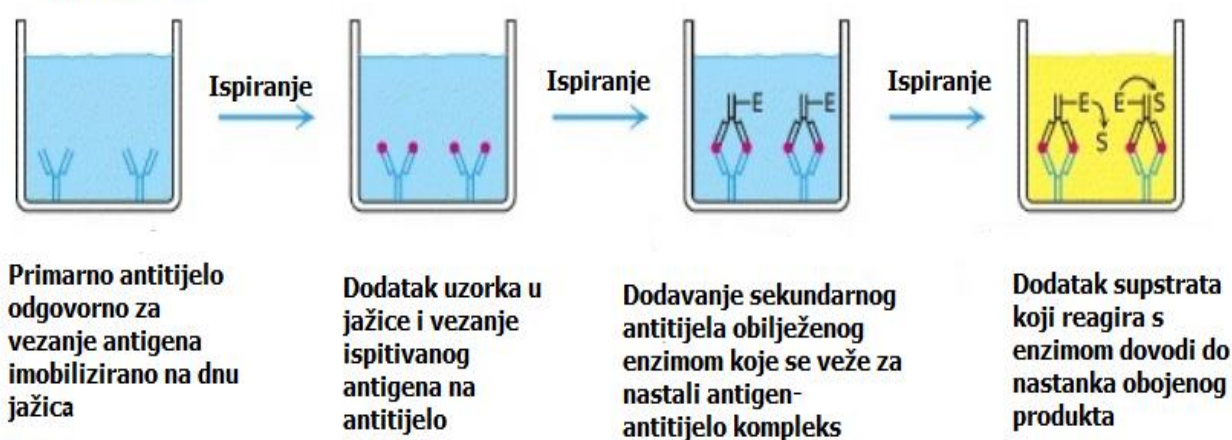
2.5.2. Vrste ELISA testa

Danas su razvijeni različiti tipovi ELISA testova zbog potrebe za većom specifičnošću testa prema sastojcima koji se određuju i koji mogu imati različitu kemijsku strukturu i svojstva, te radi dobivanja preciznijih rezultata u konačnici (Aydin, 2015). Postoji nekoliko vrsta tehnika imunološkog određivanja pomoću ELISA testa: indirektna, "sendvič", konkurentna i nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča (Butorac i sur., 2013). U prehrambenoj industriji se najčešće koriste setovi temeljeni na "sendvič" ELISA tehnici i konkurentnoj ELISA tehnici.

2.5.2.1. "Sendvič" ELISA

"Sendvič" ELISA metoda uključuje dvije vrste antitijela od kojih svako veže jedan od dva različita epitopa antigena. Pritom je primarno antitijelo visoko specifično za antigen i odgovorno za njegovo vezanje, dok je sekundarno antitijelo obilježeno enzimom odgovorno za detekciju antigena što u konačnici rezultira antigenom uklopljenim u "sendvič" između ove dvije vrste antitijela. Antitijelo odgovorno za vezanje antigena imobilizirano je na dnu jažica mikrotitarske ploče. Dodatkom analiziranog uzorka u jažice dolazi do vezanja antigena na antitijelo, dok se ispiranjem jažica uklanjaju antigeni koji se nisu vezali na primarno antitijelo. Nakon toga se dodaje sekundarno antitijelo obilježeno enzimom koje se veže za nastali antigen-antitijelo kompleks. Dodatkom supstrata koji reagira s enzimom dolazi do obojenja otopine. Što je veći udio antigena, veća je i količina vezanog antitijela obilježenog enzimom a time i izmjerena apsorbancija. Apsorbancija je izravno proporcionalna udjelu antigena prisutnom u uzorku (Aydin, 2015; Cox i sur., 2012). Ova vrsta testa se smatra čak 2-5 puta osjetljivijim od ostalih tipova ELISA testa i shodno tome se i češće koristi (Aydin, 2015). Slika 4 shematski prikazuje tijek "sendvič" ELISA metode.

" Sendvič" ELISA

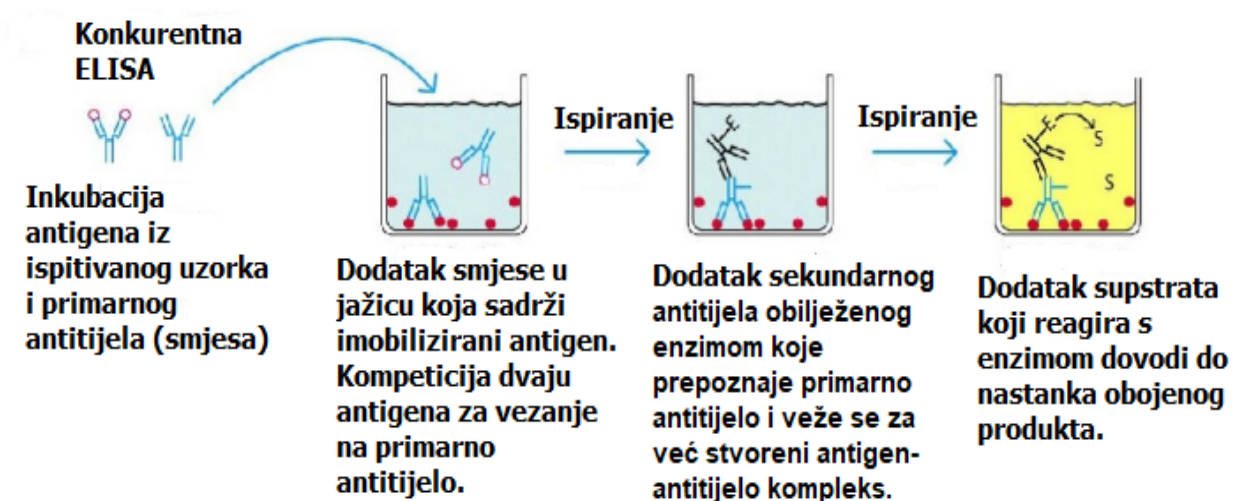


Slika 4. Shematski prikaz "sendvič" ELISA metode (Anonymous, 2015)

2.5.2.2. Konkurentna ELISA

Konkurentna ELISA uključuje antigen koji je imobiliziran na dnu jažice mikrotitarske ploče, pri čemu se u svaku od jažica koja sadrži vezani antigen dodaje uzorak s nepoznatim sadržajem antigena koji se ispituje i primarno antitijelo. Prethodno se antigen iz uzorka inkubira zajedno s primarnim antitijelom. Dolazi do kompeticije dvaju antigena za dodano antitijelo pri čemu će se prije vezati onaj antigen koji prvi dolazi u kontakt s antitijelom, a to je antigen iz

uzorka. Slijedi ispiranje jažica kojim se uklanja antigen koji se nije vezao i antitijela koja nisu reagirala, nakon čega se dodaje sekundarno antitijelo obilježeno enzimom pri čemu se ono veže za nastali antigen-antitijelo kompleks. Dodatkom supstrata specifičnog za enzim razvija se obojenje koje omogućuje kvantifikaciju antigena u analiziranom uzorku. Ukoliko u uzorku nisu prisutni antigeni, sekundarna antitijela obilježena enzimima maksimalno vežu antigen imobiliziran na dnu jažice što rezultira visokom apsorpcijom nastalog obojenog produkta. Međutim, u slučaju da uzorak sadrži antigene doći će do njihovog vezanja na enzimom obilježena sekundarna antitijela i inhibicije vezanja imobiliziranih antigena. Što je veći udio antigena u uzorku, to će se manje imobiliziranog antigena vezati na sekundarno antitijelo, intenzitet obojenja otopine bit će manji i u konačnici će izmjerena apsorbancija biti niža. U ovom slučaju je udio ispitivanog antigena u uzorku obrnuto proporcionalan intenzitetu obojenja otopine (Aydin, 2015; Besler i sur., 2002). Na slici 5 nalazi se shematski prikaz tijeka konkurentne ELISA metode.



Slika 5. Shematski prikaz konkurentne ELISA metode (Anonymous, 2015)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja, analizirano je ukupno 8 uzoraka sladoleda od čokolade u kojima je određen udio potencijalnih alergena kikirikija pomoću ELISA metode. Od toga je četiri uzorka sladoleda od čokolade bilo iz različitih slastičarnica, dok su preostala četiri uzorka bila podrijetlom iz trgovačkih lanaca i radilo se o uzorcima različitih proizvođača. Navedeni uzorci kupljeni su na zagrebačkom tržištu i označeni su sljedećim oznakama: od SS1 do SS4 za uzorke sladoleda iz slastičarnica te od ST1 do ST4 za uzorke sladoleda iz trgovačkih lanaca.

3.1.2. Laboratorijska oprema i pribor

Tijekom laboratorijske analize korišteni su sljedeći uređaji:

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



Slika 6. Centrifuga



Slika 7. ELISA čitač

Laboratorijsko posuđe i pribor:

- automatska jednokanalna pipeta
- Erlenmeyerove tikvice od 100 mL
- Falcon epruvete
- filter-papir
- laboratorijska čaša od 100 mL
- laboratorijska čaša od 250 mL
- mikrotitarska ploča, AgraQuant, Romer Labs, Austrija
- nastavci za pipetu
- odmjerna tikvica od 200 mL
- pipeta od 10 mL
- plastične žličice
- propipeta
- set od 8 mikrojažica

- stakleni lijevak
- staničevina.

3.1.3. Reagensi

- AgraQuant, Peanut, Extraction & Sample Dilution Buffer, Romer Labs, Austrija (ekstrakcijski pufer)
- AgraQuant, Peanut, Wash Buffer, 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 iz seta za ELISA test

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema otopina reagensa

Otopine ekstrakcijskog pufera i pufera za ispiranje pripremljene su u količini potrebnoj za provođenje analize.

Koncentrirani ekstrakcijski pufer razrijeđen je destiliranom vodom u omjeru 1:10 i čuvan na temperaturi od 4 °C do daljnje upotrebe.

U odmjernu tikvicu otpipetiran je koncentrat pufera za ispiranje, razrijeđen vodom u omjeru 1:10 i čuvan pri 4 °C.

Prije upotrebe, pripremljene otopine pufera su izvađene iz hladnjaka kako bi se temperirale na sobnu temperaturu i bile spremne za korištenje.

3.2.2. Ekstrakcija uzoraka

Prije početka analize, reprezentativni dio svakog uzorka je najprije homogeniziran. Potom je od tako homogeniziranog uzorka na analitičkoj vagi odvagnut 1,0000 g u Falcon epruveti u koju je naposljetku dodano 20 mL razrijeđenog ekstrakcijskog pufera. Sadržaj epruveta je vorteksiran do konačne homogenizacije, inkubiran 15 minuta u vodenoj kupelji prethodno zagrijanoj na temperaturu od 60 °C i centrifugiran 10 minuta pri 2000 okretaja. Nakon centrifugiranja, ekstrakti su profiltrirani preko filter papira s ciljem dobivanja bistrog supernatanta. Dobiveni filtrat je predstavljao uzorak u kojem će biti određen udio potencijalno prisutnih alergena kikirikija ELISA metodom.

3.2.3. Analiza uzoraka ELISA testom

3.2.3.1. Princip određivanja

AgraQuant kikiriki test, korišten u svrhu ove analize, obzirom na princip određivanja predstavlja "sendvič" ELISA test koji se temelji na imunoenzimskoj reakciji. Iz ispitivanog uzorka proteini kikirikija ekstrahiraju se pomoću ekstrakcijskog pufera, nakon čega se dobiveni ekstrakti nanose na mikrojažice sa sadržajem antitijela pri čemu dolazi do vezanja proteina kikirikija i antitijela. Poslije koraka ispiranja kojim se odstranjuju nevezani antigeni, u jažice se dodaje konjugat, odnosno enzimom obilježeno sekundarno antitijelo koje se veže za nastali antigen-antitijelo kompleks nakon čega se sadržaj mikrojažica inkubira. Zatim slijedi novo ispiranje nakon kojeg se dodaje supstrat specifičan za enzim pri čemu se razvija plavo obojenje čiji je intenzitet izravno proporcionalan udjelu kikirikija u uzorku. Nakon određenog vremena inkubacije dodaje se stop-otopina koja uzrokuje promjenu nastalog

plavog obojenja u žuto i reakcija se zaustavlja. Nastalo obojenje mjeri se spektrofotometrijski pri apsorbanciji od 450 nm, a na temelju baždarnog dijagrama standarda (Slika 10) određuje se udio prisutnih potencijalnih alergena kikirikija u ispitivanim uzorcima.

3.2.3.2. Postupak određivanja

Držać od osam mikrojažica sa sadržajem antitijela postavljen je na mikrotitarsku ploču. U svaku jažicu je pomoću jednokanalne mikropipete otpipetirano po 100 μ L pročišćenog filtrata pri čemu je za svaki uzorak upotrijebljen čisti nastavak za mikropipetu. Sadržaj mikrojažica je potom inkubiran na sobnoj temperaturi u vremenu od 20 minuta bez protresanja mikrotitarske ploče kako ne bi došlo do međusobnog miješanja sadržaja te time i kontaminacije.

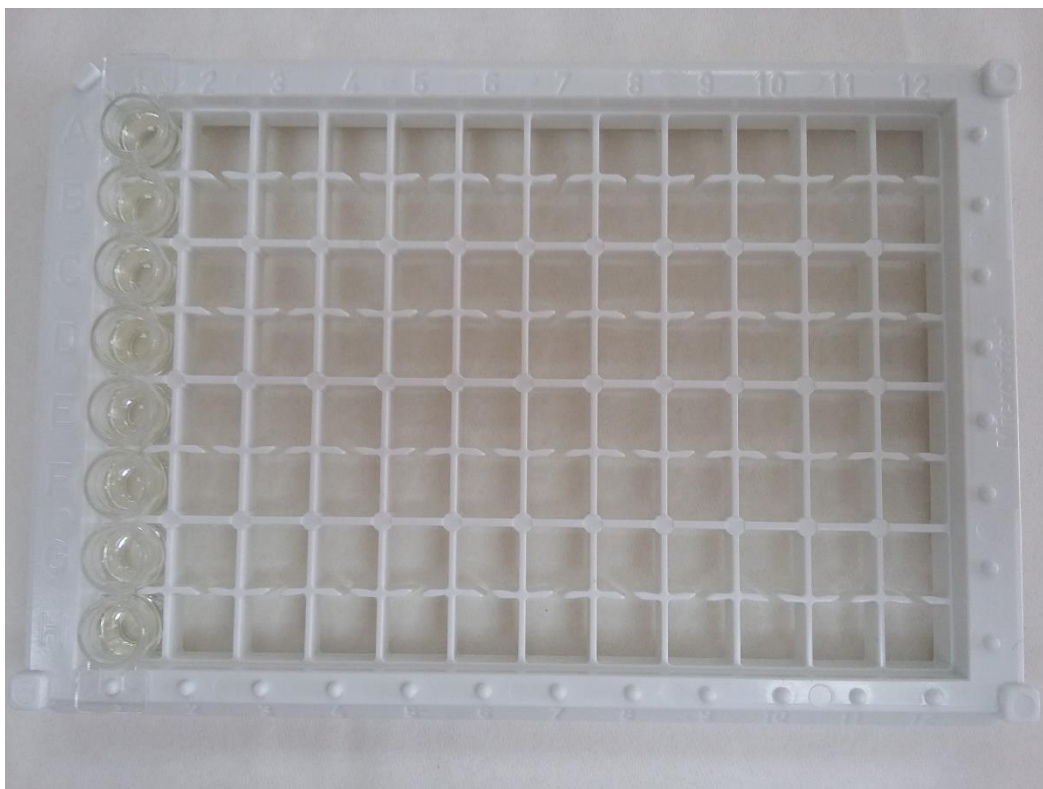
Nakon toga je sadržaj mikrojažica ispražnjen u otpadni spremnik preokretanjem mikrotitarske ploče i svaka jažica isprana dodatkom 100 μ L razrijeđenog pufera za ispiranje. Na ravnu površinu postavljeno je nekoliko slojeva staničevine o koju je lupkanjem držača s mikrojažicama iz njih odstranjena suvišna voda zaostala od ispiranja i time provedeno njihovo sušenje. Postupak ispiranja i sušenja mikrojažica ponovljen je ukupno 5 puta pri čemu se pazilo da držać s mikrojažicama bude stabilan. Potom je u svaku mikrojažicu otpipetirano 100 μ L konjugata iz bočice sa zelenim poklopcem i inkubirano tijekom 20 minuta pri sobnoj temperaturi bez pomicanja držača kako ne bi došlo do miješanja sadržaja mikrojažica i time njihove međusobne kontaminacije. Okretanjem mikrotitarske ploče za 180° sadržaj mikrojažica je ispražnjen nakon čega je svaka od njih isprana ukupno 5 puta razrijeđenim puferom za ispiranje i prosušena lupkanjem držača o staničevinu.

Zatim je u svaku jažicu otpipetirano 100 μ L supstrata iz bočice s plavim poklopcem, te je sadržaj mikrojažice inkubiran u tami tijekom 20 minuta pri sobnoj temperaturi.

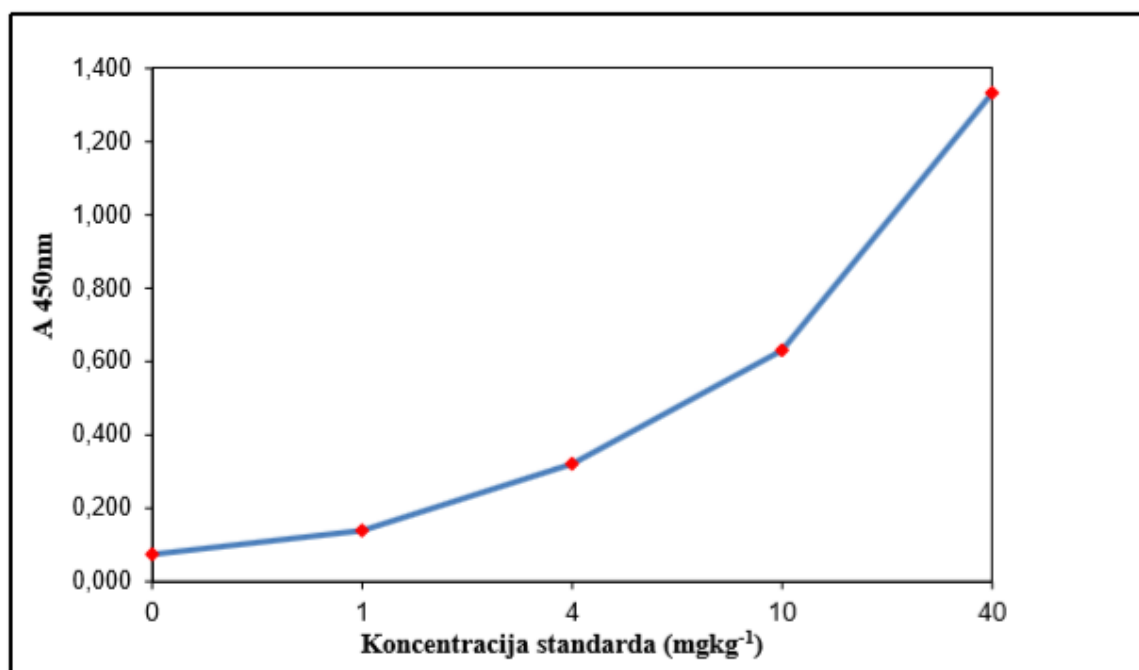
Nakon perioda inkubacije u jažice je otpipetirano 100 μ L "stop" otopine iz bočice s crvenim poklopcem pri čemu je došlo do promjene boje otopine iz plave u žutu.

Mikrotitarska ploča s mikrojažicama (Slika 9) oprezno je prenesena do ELISA čitača s filterom od 450 nm (Slika 7) gdje su pomoću računalnog programa očitane vrijednosti apsorbancije za svaku mikrojažicu i dobiveni rezultati zabilježeni.

Pomoću prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda kikirikija određen je udio alergena kikirikija u svakom od ispitivanih uzoraka (Slika 10). Koncentracije otopina standarda korištene za izradu baždarnog dijagrama iznosile su 0, 1, 4, 10 i 40 mgkg⁻¹.



Slika 9. Mikrotitarska ploča



Slika 10. Baždarni dijagram standarda kikirikija

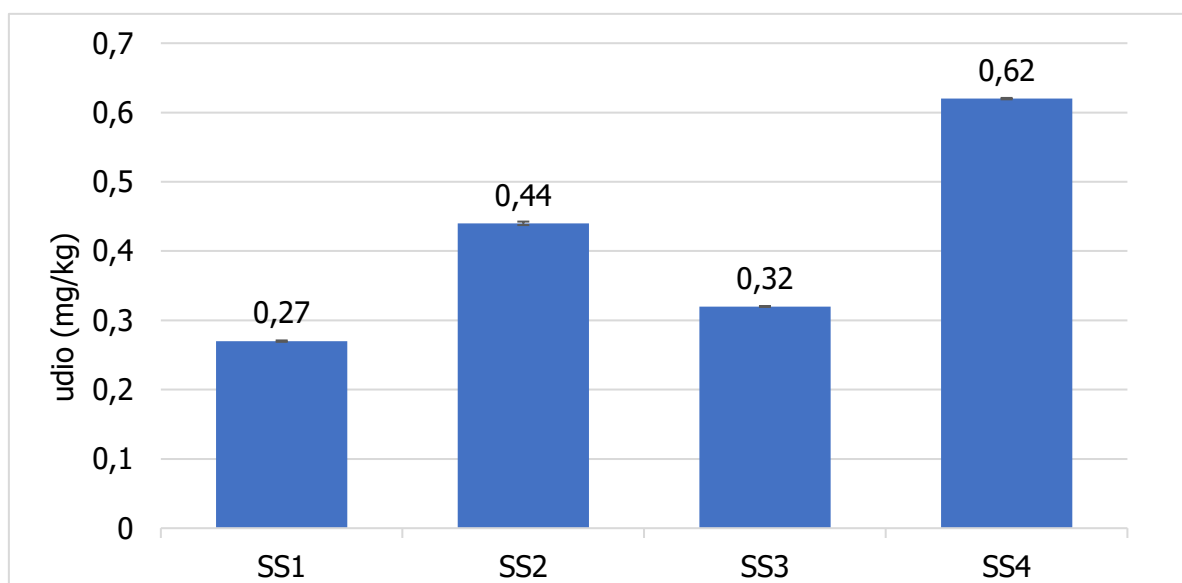
3.2.4. Obrada podataka

Vrijednosti dobivene mjerenjem analizirane su pomoću Microsoft Excel 2016 programa. Za prikaz rezultata korištene su standardne metode deskriptivne statistike i to srednja vrijednost ($\bar{X}$), prosječna vrijednost i standardna devijacija (SD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja ELISA testom analizirano je ukupno 8 uzoraka sladoleda od čokolade pri čemu je određen udio potencijalnih alergena kikirikija u četiri uzorka sladoleda iz različitih slastičarnica i u četiri uzorka sladoleda različitih proizvođača podrijetlom iz trgovačkih lanaca. Uzorci su označeni pripadajućim oznakama: od SS1 do SS4 za uzorke sladoleda iz slastičarnica te od ST1 do ST4 za uzorke sladoleda iz trgovačkih lanaca. Rezultati određivanja udjela potencijalnih alergena kikirikija (mgkg^{-1}) prikazani su na slikama 11 i 12, a tablice 4 i 5 sadrže navode u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka sladoleda od čokolade neposredno vezane uz prisustvo alergena.

Kako bi udio potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima bio kvantitativno određen, tijekom ovog istraživanja korišten je AgraQuant Peanut Assay set za ELISA metodu čiji je proizvođač RomerLabs, Austrija. Limit detekcije korištenog ELISA testa iznosi $0,10 \text{ mgkg}^{-1}$, a udio alergena kikirikija izražen je u mgkg^{-1} .



Slika 11. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n=4$) sladoleda od čokolade iz različitih slastičarnica

Rezultati analize su pokazali da je u sva četiri ispitivana uzorka sladoleda od čokolade iz različitih slastičarnica detektiran udio alergena kikirikija. Najniži udio alergena kikirikija određen je u uzorku "SS1" i iznosi $0,27 \text{ mgkg}^{-1}$ pri čemu u okviru informacija o hrani prisutnim na deklaraciji nije navedeno da proizvod može sadržavati kikiriki ali je istaknuto da može sadržavati tragove drugih alergena. S druge strane, najviši udio alergena kikirikija

određen je u uzorku "SS4" te iznosi $0,62 \text{ mgkg}^{-1}$ gdje u okviru informacija o hrani također nije naveden kikiriki ali je naveden sadržaj tragova drugih alergena. Upravo se prisustvo kikirikija u ispitivanim uzorcima može povezati s činjenicom da je tijekom tehnološkog procesa proizvodnje sladoleda moguća unakrsna kontaminacija.

Prosječna vrijednost udjela alergena kikirikija u uzorcima sladoleda od čokolade iz različitih slastičarnica iznosi $0,41 \text{ mgkg}^{-1}$.

Tablica 4. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka sladoleda od čokolade iz različitih slastičarnica, neposredno vezani uz prisustvo alergena

Uzorak	Navodi neposredno vezani uz prisustvo alergena
SS1	"Može sadržavati tragove orašastih plodova i glutena."
SS2	"Sadrži tragove mlijeka, jaja, glutena i orašastih plodova."
SS3	"Sadrži mlijeko."
SS4	"Sadrži mlijeko, soju i gluten."



Slika 12. Rezultati određivanja udjela potencijalnih alergena kikirikija (mgkg⁻¹) u uzorcima "ST2" - "ST4" sladoleda od čokolade iz trgovačkih lanaca; "ST1" < LOD* *LOD – limit detekcije (engl. *Limit Of Detection*) = 0,10 mgkg⁻¹

Među ispitivanim uzorcima sladoleda od čokolade iz trgovačkih lanaca, u tri od ukupno četiri uzorka detektirani su alergeni kikirikija. Najniži udio alergena kikirikija određen je u uzorku "ST3" i iznosi 0,12 mgkg⁻¹ pri čemu u okviru informacija u hrani prisutnim na deklaraciji proizvoda nema navoda vezanog uz sadržaj kikirikija. Najveći udio alergena kikirikija određen je u uzorku "ST2" i iznosi 0,35 mgkg⁻¹, a deklaracija proizvoda ne sadrži navod o mogućem sadržaju kikirikija niti ostalih alergena. U uzorku "ST1" udio alergena kikirikija je bio ispod vrijednosti limita detekcije metode te iz tog razloga ovim testom nije kvantificiran.

Tablica 5. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka sladoleda od čokolade iz trgovačkih lanaca, neposredno vezani uz prisustvo alergena

Uzorak	Navodi neposredno vezani uz prisustvo alergena
ST1	"Sadrži mlijeko, soju i gluten."
ST2	(nema navoda)
ST3	"Sadrži mlijeko. Može sadržavati soju."
ST4	"Može sadržavati kikiriki, jaja, gluten i orašasto voće."

Osobe s alergijskom preosjetljivosti na kikiriki jedino izbjegavanjem proizvoda koji ga sadrže mogu spriječiti potencijalnu alergijsku reakciju. Kako bi potrošači znali koji proizvodi sadrže kikiriki, o tome su ih dužni obavijestiti proizvođači putem navoda u okviru informacija o hrani koji se nalaze na deklaraciji proizvoda te u slučaju nepretpakirane hrane u blizini proizvoda ili usmenim putem (Spanjersberg i sur., 2010).

Mnogi proizvođači koji ne mogu jamčiti odsustvo alergena u namirnici iz predostrožnosti odlučuju označiti proizvode navodom "može sadržavati", čime se upozorava na moguće prisustvo alergena u proizvodu i sprječava potencijalna alergijska reakcija u preosjetljivih osoba. S druge strane, ako su mogućnosti za kontaminaciju zanemarive, ovakav navod nepotrebno ograničava potrošača u konzumaciji tog proizvoda (Spanjersberg i sur., 2010). Međutim, kako imunološki odgovor u preosjetljivih osoba mogu izazvati udjeli proteina kikirikija u rasponu od čak 0,1 do 1000 mg (Chen i sur., 2012), tako neki preosjetljivi pojedinci prilikom izlaganja manjim količinama alergena mogu imati snažne reakcije, a kod drugih se reakcija može javiti nakon izlaganja mnogo većim dozama (Jackson, 2003). Iz tog razloga, oba rješenja, izostavljanje navoda u kontaminiranih proizvoda i navođenje sadržaja alergena u slučaju neznatne kontaminacije, su nepoželjna. Upravo zato što je takve situacije teško predvidjeti i procijeniti, za slučajnu ili nenamjernu prisutnost deklariranog zakonski obveznih alergena i njegovih tragova se treba temeljiti na analizi opasnosti i procjeni pripadajućih rizika (Puhač Bogadi, 2016; Spanjersberg i sur., 2010).

5. ZAKLJUČAK

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

1. Imunoenzimskom ELISA metodom, potencijalni alergeni kikirikija detektirani su u sedam od ukupno osam analiziranih uzoraka sladoleda od čokolade iz različitih slastičarnica i trgovačkih lanaca.
2. Raspon unutar kojeg se kretao udio alergena kikirikija u analiziranim uzorcima sladoleda od čokolade iz slastičarnica iznosi $0,27\text{--}0,62\text{ mgkg}^{-1}$. U uzorcima sladoleda iz trgovačkih lanaca udio se kretao u rasponu od $0,12$ do $0,35\text{ mgkg}^{-1}$. Obzirom na prosječne vrijednosti, udio alergena kikirikija bio je viši u uzorcima sladoleda iz slastičarnice ($0,41\text{ mgkg}^{-1}$) u odnosu na uzorke sladoleda iz trgovačkih lanaca ($0,20\text{ mgkg}^{-1}$).
3. Najviši udio alergena kikirikija određen je u uzorku "SS4" iz slastičarnice te iznosi $0,62\text{ mgkg}^{-1}$, pri čemu je u okviru informacija o hrani naveden sadržaj alergena među kojima nije istaknut kikiriki.
4. Između sedam analiziranih uzoraka u kojima su ELISA metodom detektirani alergeni kikirikija, jedino uzorak "ST4" iz trgovačkog lanca sadrži navod u okviru informacija o hrani vezan uz prisustvo alergena kikirikija.

6. LITERATURA

- Anonymous (2015) ELISA - Principle, Types and Applications, <<http://www.microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications>>. Pristupljeno 25. svibnja 2018.
- 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.
- Barros A., Cosme F. (2013) Allergenic Proteins in Foods and Beverages. *Food Technology and Biotechnology* **51 (2)**: 153 – 158.
- Besler M., Kasel U., Wichmann G. (2002) Review: Determination of Hidden Allergens in Foods by Immunoassays. *Internet Symposium on Food Allergens* **4 (1)**: 1 – 18.
- Bošnjir J., Colić Barić I., Ćurić D., Mandić M., Pollak L., Teklić T., Valek M. (2009) Alergije podrijetlom iz hrane, Hrvatska agencija za hranu (HAH). str. 6-7., 15 – 16.
- Bruijnzeel – Koomen C., Ortolani C., Aas K., Bindslev –Jensen C., Bjorksten B., Moneret – Vautrin D., Wuthrich B. (1995) Adverse reactions to food. *Allergy* **50**: 623 – 635.
- Burks A. W., Sampson H. A., Bannon G. A. (1998) Peanut allergens. *Allergy* **53**: 725 – 730.
- Burks A. W. (2008) Peanut Allergy. *Lancet* **371**: 1538 – 1546.
- Butorac A., Marić M., Badanjak Sabolović M., Hruškar M., Rimac Brnčić S., Bačun Družina V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8 (3-4)**: 90 – 101.
- Chapman J.A., Bernstein I. L., Lee R. E., Oppenheimer J., (2006) Food allergy: A practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* **96**: S1 – 68.
- Chen J., Xia L., Wu X., Yang S., Ji K., Liu Z., Tang M., 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.
- Clarke M. C. A., Kilburn S. A., Hourihane J. O`B., Dean K. R., Warner J. O., Dean T. P. (1998) *Clinical and Experimental Allergy* **28**: 1251 – 1257.

Cochrane S., Beyer K., Clausen M., Wjst M., Hiller R., Nicoletti C., Szepefalusi Z., Savelkoul H., Breiteneder H., Manios Y., Crittenden R., Burney P. (2009) Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy* **64**: 1246 – 1255.

Cox K. L., Devanarayan V., Kriauciunas A., Manetta J., Montrose C., Sittampalam S. (2012) *Assay Guidance Manual: Immunoassay Methods*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>>. Pristupljeno 25. svibnja 2018.

Flinterman A. E., Van Hoffen E., Den Hartog Jager C. F., Koppelman S., Pasmans S. G., Hoekstra M. O., Bruijnzeel – Koomen C. A., Knulst A. C., Knol E. F. (2007) Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time. *Clinical and Experimental Allergy* **37**: 1221 – 1228.

Heine R. G. (2015) Food Intolerance and Allergy. U: *Pediatric Nutrition in Practice*, 2. izd., Koletzko B., ur., World Review of Nutrition and Dietetics, Basel, Karger, str. 195 – 202.

Hong X., Tsai H., Wang X. (2009) Genetics of food allergy. *Current Opinion in Pediatrics* **21**: 770 – 776.

Jackson W. F. (2003) Food Allergy. International Life Sciences Institute, <http://ilsi.eu/wp-content/uploads/sites/3/2016/06/C2003Food_All.pdf>. Pristupljeno 28. travnja 2018.

Katalenić S. (2007) Alergeni u hrani – zakonodavstvo i obveze proizvođača. *Hrana i zdravlje* **3 (9)**: 1 – 4.

Kolaček S. (2011) Preosjetljivost na hranu u dječjoj dobi. *Acta Medica Croatica* **65**: 155 – 161.

Lack G. (2008) Epidemiologic risks for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **121**: 1331 – 1336.

Levetin E., McMahon K. (2008) Legumes. U: *Plants and society*. 5.izd. The McGraw – Hill Companies, str. 212 – 213.

Martinis I. (2004) Nutritivna alergija. *Medix* **52**: 86 – 88.

Ministarstvo poljoprivrede (2015) Vodič za informiranje potrošača o nepretpakiranoj hrani, str. 5 – 19.,

<http://www.mps.hr/datastore/filestore/115/Vodic_za_informiranje_potrosaca_o_nepretpakiranoj_hrani_2015.pdf>. Pristupljeno 20. svibnja 2018.

Montserrat M., Sanz D., Juan T., Herrero A., Sánchez L., Calvo M., Pérez M. D. (2015) Detection of peanut (*Arachis hypogaea*) allergens in processed foods by immunoassay: Influence of selected target protein and ELISA format applied. *Food Control* **54**: 300 – 307.

Moore L. E., Stewart P. H., deShazo R. D. (2017) Food Allergy: What We Know Now. *The American Journal of the Medical Sciences* **353** (4): 353 – 366.

Palladino C., Breiteneder H. (2018) Peanut allergens. *Molecular Immunology*, In Press, <<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.04.005>>. Pristupljeno 29. travnja 2018.

Panjkota Krbavčić I., Marković K., Bogdanović T., Hršak L., Zeljko M., Bituh M., Vahčić N. (2017) Alergeni kikirikija u uzorcima čokolada, krem-proizvoda i kolača. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **12**: 77 – 82.

Pomés A., Helm M. R., Bannon G. A., Burks A. W., Tsay A., Chapman M. D. (2002) Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**: 640 – 645.

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 10. lipnja 2018.

Runje M., Cvrtila Ž. (2005) Elisa u analitici hrane. *Meso* **7**: 92 – 95.

Sampson H. A. (1999) Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103** (5): 717 – 728.

Sampson H.A. (2004) Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**: 805 – 819.

Sicherer S.H., Sampson H.A. (2007) Peanut allergy: emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**: 491 – 503.

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 Additives and Contaminants* **27** (2): 169 – 174.

Turkalj M., Mrkić I. (2012) Alergijske reakcije na hranu. *Liječnički vjesnik* **134**: 168 – 173.

Uredba (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća (2011) *Službeni list Europske Unije* L 304 (SL L 304/2011)

Van Hengel A. J. (2007) Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**: 111 – 118.

Izjava o izvornosti

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

Adriana Čurčić

ime i prezime studenta

