Određivanje alergena kikirikija u uzorcima krem proizvoda i čokolada ELISA metodom

Zeljko, Mladena

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:529552

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Mladena Zeljko

690/USH

ODREĐIVANJE ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA KREM PROIZVODA I ČOKOLADA ELISA 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 izv.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 KREM PROIZVODA I ČOKOLADA ELISA METODOM

Mladena Zeljko 690/USH

Sažetak: Tijekom ovog istraživanja određeni su potencijalni alergeni kikirikija u osam uzoraka krem proizvoda i osam uzoraka čokolada s lješnjakom pomoću ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metode te je ispitan stav potrošača o navodima potencijalne prisutnosti alergena kikirikija na deklaraciji tih proizvoda. Samo u jednom od analiziranih uzoraka nisu detektirani alergeni kikirikija, dok je u ostalima određen udio u rasponu od 0,27 ± 0,010 do 4,05 ± 0,030 $mgkg^{-1}$. Između analiziranih uzoraka u kojima su određeni alergeni kikirikija, samo šest sadrži navod o potencijalnoj prisutnosti alergena kikirikija na deklaraciji. Ispitivanjem stavova potrošača o navodima na deklaraciji krem proizvoda i čokolada utvrđeno je da navod "Može sadržavati kikiriki u tragovima" 59 % ispitanika izdvaja kao najpoznatiji. Tijekom ovog istraživanja, u sedam analiziranih uzoraka krem proizvoda te dva uzorka čokolada s lješnjakom bez navoda, ELISA metodom detektirani su alergeni kikirikija.

Ključne riječi: alergeni, kikiriki, ELISA, čokolada, krem proizvod
Rad sadrži: 42 stranice, 14 slika, 4 tablice, 73 literaturna navoda, 1 prilog
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof.dr.sc. Nada Vahčić
2. izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković
3. doc.dr.sc. Martina Bituh
4. prof.dr.sc. Draženka Komes (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

S**cientific area:** Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF PEANUT ALLERGENS IN COCOA CREAM AND CHOCOLATE BY ELISA METHOD

Mladena Zeljko 690/USH

Abstract: In this study the commercial ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) test was used for determination of potential peanut allergens in eight samples of cocoa cream and eight samples of chocolate with hazelnut, and also the consumers opinion toward advisory labelling was examined. One sample showed no traces of peanut while in the rest of samples peanut allergens were determined in the range from 0,27 ± 0,010 to 4,05 ± 0,030 $mgkg^{-1}$. Among analysed samples in which peanut allergens were determined, only six of them had advisory labelling. 59 % of examined consumers are most familiar with advisory label: "May contain peanuts in traces". In this study, in seven samples of cocoa cream and two samples of chocolate with hazelnut, which had no advisory label, peanut allergens were detected by ELISA method.

Keywords: allergens, peanut, ELISA, chocolate, cocoa cream

Thesis contains: 42 pages, 14 figures, 4 tables, 73 references, 1 supplement

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, Associate professor

Reviewers:
1. PhD. Nada Vahčić, Full Professor
2. PhD. Ksenija Marković, Associate Professor
3. PhD. Martina Bituh, Assistant Professor
4. PhD. Draženka Komes, Full Professor (substitute)

Thesis defended: 29th September 2016

Sadržaj

1. UVOD ... 1
2. TEORIJSKI DIO ... 2
2.1. NUTRITIVNA ALERGIJA ... 2
2.1.1. Alergija na sastojke iz kikirikija ... 4
2.2. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA ... 5
2.2.1. Određivanje alergena kikirikija ... 6
2.3. ELISA METODA ... 7
2.3.1. Primjena ELISA metode u analitici hrane ... 7
2.3.2. ELISA metoda u određivanju alergena ... 8
2.4. ALERGENI I ZAKONSKA REGULATIVA ... 11
3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 15
3.1. MATERIJAL ... 15
3.1.1. Uzorci ... 15
3.1.2. Ispitanici ... 15
3.1.3. Kemikalije ... 15
3.1.4. Laboratorijska oprema i pribor ... 16
3.2. METODE RADA ... 18
3.2.1. Priprema reakcijskih otopina ... 18
3.2.2. Ekstrakcija uzoraka ... 18
3.2.3. ELISA test ... 19
3.2.4. Ispitivanje stavova potrošača o kikirikiju i proizvodima koji uzrokuju alergije ... 21
3.2.5. Obrada podataka ... 21
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 22
4.1. UDIO POTENCIJALNIH ALERGENA KIKIRIKIJA ODREĐEN ELISA TESTOM U UZORCIMA ČOKOLADA I KREM PROIZVODA ... 22
4.2. STAVOVI POTROŠAČA O KIKIRIKIJU I PROIZVODIMA OD KIKIRIKIJA KAO TVARIMA ILI PROIZVODIMA KOJI UZROKUJU ALERGIJE ... 26
5. ZAKLJUČCI ... 34
6. LITERATURA ... 35
7. PRILOZI

1. UVOD

Pojava nutritivne alergije posljednjih nekoliko godina bilježi porast, a jedna od češćih alergija je alergija na proteine kikirikija. Obzirom na porast broja slučajeva alergija na hranu ali i činjenice da izloženost osoba koje pate od alergije na kikiriki većim koncentracijama ovog alergena može izazvati anafilaktički šok sa smrtnim posljedicama, prehrambena tehnologija sve više napora ulaže u sustave kontrole i dobru proizvođačku praksu kako bi smanjila rizik križne kontaminacije alergenima. Najučinkovitiji način za sprečavanje pojave alergijskih reakcija je prevencija, odnosno striktno izbjegavanje namirnica koje sadrže alergen, stoga svakodnevnica osoba koje imaju nutritivnu alergiju uključuje detaljno čitanje deklaracija prehrambenih proizvoda. Na deklaracijama prehrambenih proizvoda mogu se naći različiti navodi o potencijalnoj prisutnosti alergena kikirikija, odnosno unutar iste skupine proizvoda postoje oni koji sadrže navode te oni bez navoda o potencijalnoj prisutnosti kikirikija.

Jedna od imunoenzimskih metoda koja se koristi za detekciju alergena je ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metoda koja se bazira na specifičnom vezanju antitijela i antigena (protein kikirikija).

Cilj ovog istraživanja bit će odrediti udio potencijalnih alergena kikirikija u osam uzoraka krem proizvoda i osam uzoraka čokolada s lješnjakom pomoću ELISA testa, te prikupiti stavove potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NUTRITIVNA ALERGIJA

Nutritivna alergija ili preosjetljivost na hranu je reakcija imunološkog sustava organizma na neki od sastojaka hrane smatrajući ga stranom tvari (antigenom). Gotovo uvijek antigen je protein (Bush i Hefle, 1996). Važno je razlikovati imunološki posredovanu reakciju na sastojak hrane (protein), tada govorimo o alergiji na određenu hranu, te intoleranciju na određeni sastojak hrane (primjerice laktozu) koja nije posredovana imunološkim sustavom. Alergije na hranu mogu izazvati trenutnu hipersenzibilnost (reakcija se odvija tijekom jedne minute do jednog sata nakon konzumacije) ili odgođenu hipersenzibilnu reakciju organizma (reakcija se odvija tijekom 6 do 24 sata nakon konzumacije).

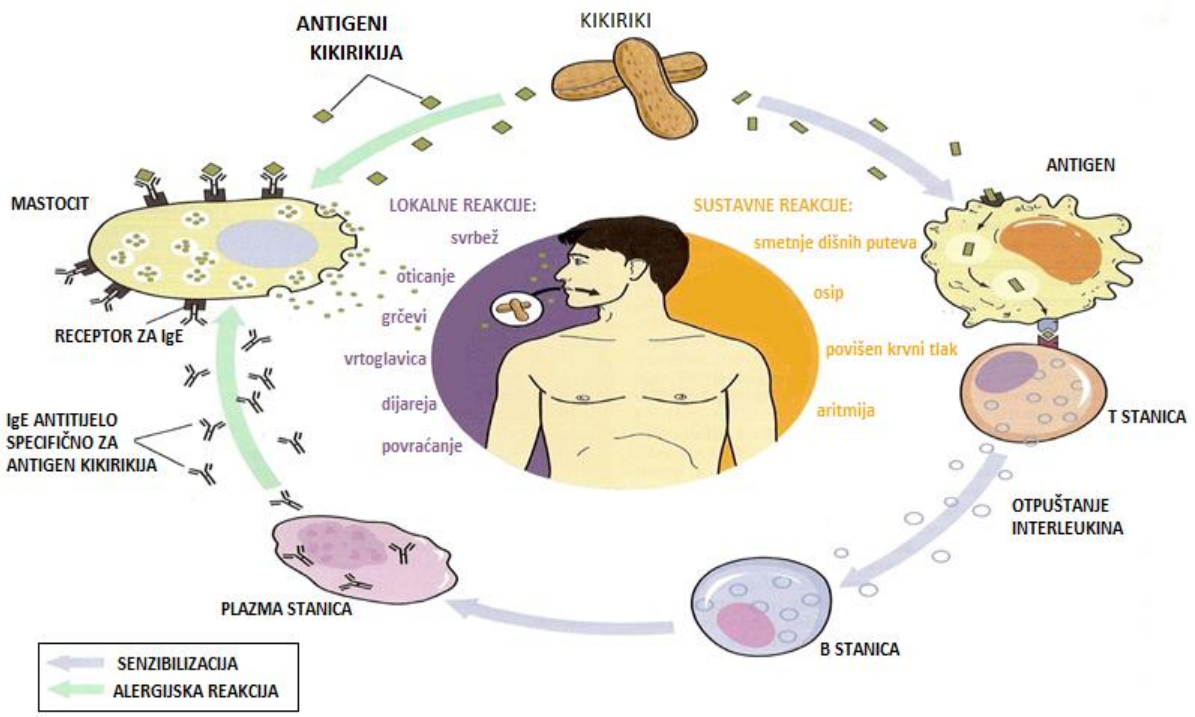
Trenutnu hipersenzibilnost najčešće uzrokuju imunoglobulin E (IgE) antitijela. Naime kada imunološki sustav, odnosno B stanice imunološkog sustava, prvi put stupe u kontakt s alergenom one stvaraju antitijela (najčešće imunoglobuline E), koja se vežu na mastocite i na taj način stvaraju stanice osjetljive na dotični alergen. U prvoj fazi nema simptoma alergije, međutim ponovnim unosom dotičnog alergena u organizam (Slika 1) dolazi do alergijske reakcije (Taylor i Hefle, 2001). Mastociti u slučaju ponovnog kontakta s alergenom (antigenom) otpuštaju molekule koje uzrokuju alergijsku reakciju (Church i sur., 2003). Najzaslužniji za alergijske reakcije je histamin koji uzrokuje upalne procese, svrbež te kontrakcije glatkog mišićja krvnih žila, probavnog i dišnog sustava (Bush i Taylor, 2003).

Za razliku od trenutne hipersenzibilne reakcije posredovane imunoglobulinom E, odgođena hipersenzibilna reakcija pokazuje simptome tek nakon 6 do 24 sata nakon unosa hrane, reakcija je postupna, svoj vrhunac doseže aproksimativno 48 sati nakon unosa, a može djelovati i do 72 do 96 sati. Mehanizam ovakve reakcije podrazumijeva interakciju antigena i T limfocita koja stimulira otpuštanje citokina i limfokina i dovodi do lokalnih upalnih procesa (Sampson, 1991).

Prevencija nutritivne alergije posredovane imunoglobulinima uključuje izbjegavanje određenih namirnica, odnosno sastojaka hrane (Taylor, 1990), te zbog toga pojedinci koji imaju nutritivne alergije obično proučavaju deklaracije na prehrambenim proizvodima jer i najmanji tragovi alergena mogu izazvati alergijsku reakciju (Gern i sur., 1991). Veliki problem stvaraju skriveni alergeni, odnosno alergeni koji se pojavljuju u tragovima i ne

ubrajaju se u sastojke proizvoda. Nekoliko je razloga pojave skrivenih alergena u prehrambenoj industriji koje potrošača (osobu s nutritivnom alergijom) mogu dovesti u neposrednu opasnost (Hugget i Hischenhuber, 1998):

- križna kontaminacija uslijed korištenja iste opreme za proizvodnju proizvoda koji sadrže alergen i proizvoda koji ne sadrže alergen
- križna kontaminacija tijekom procesiranja hrane (primjerice neplaniranim postupcima obrade i izvanrednim situacijama)
- promjena recepture (formule) dobivanja proizvoda bez promjene deklaracije
- sirovine mogu sadržavati nepoznate primjese
- nepotpuna ili netočna lista sastojaka
- nerazumijevanje i pogrešno razumijevanje navedenih izraza i naziva sastojaka ili alergena



Slika 1. Shematski prikaz procesa senzibilizacije i alergijske reakcije (Mahan i Escott-Stump, 2008)

2.1.1. Alergija na sastojke iz kikirikija

Kikiriki (*Arachis hypogaea*) je jeftin, nutritivno bogat izvor hrane za ljude diljem svijeta (Reese i Lehrer, 1999). Konzumira se cijeli, prženi te u obliku proizvoda od kikirikija poput kikiriki maslaca i ulja kikirikija. Alergija na sastojke iz kikirikija, odnosno alergija na kikiriki ubraja se u prvih osam najčešćih nutritivnih alergija. Jedno od istraživanja pokazalo je da alergija na kikiriki pogađa 0,8 % adolescenata i 0,6 % odraslih osoba u SAD-u (Sampson, 2004), dok u Francuskoj 1 % stanovništva ima alergiju na kikiriki (Kanny i sur., 2001), a procjena za Europu je oko 0,4 % (Nwaru i sur., 2014). Posljednjih nekoliko godina zabilježen je porast pojave ove nutritivne alergije za koju je poznato da već male količine alergena (0,1 do 1000 mg) izazivaju alergijske reakcije (Wensing i sur., 2002). Alergija na kikiriki prednjači po broju smrtnih slučajeva vezanih uz alergijske reakcije u SAD-u (Bock i sur., 2007). Ne postoji učinkovita terapija lijekovima za osobe alergične na kikiriki te je zbog toga naglasak na prevenciji, odnosno sustavnom označavanju prehrambenih proizvoda i deklariranju alergena. Istraživanja su pokazala kako prag osjetljivosti na alergen kikirikija, odnosno najmanja količina koja izaziva alergijsku reakciju, iznosi 4 mg kikirikija, dok za bakalar primjerice iznosi 6 mg, a za bjelanjak 50 mg (Hansen i Bindslev-Jensen, 1992; Norgaard i Bindslev-Jensen, 1992). Kratkotrajni simptomi javljaju se i pri konzumaciji 100 μg proteina kikirikija, a ozbiljna reakcija pri konzumaciji 5 mg proteina kikirikija (Hourihane i sur., 1997).

Plod kikirikija u prosjeku sadrži oko 29 % proteina (Freeman i sur., 1954) pri čemu otprilike 20 % ukupnih proteina predstavlja glavni alergen Ara h 1 (molekulske mase 63 do 64 kD), a 10 % alergen Ara h 2 (molekulske mase 17 kD) (Koppelman i sur., 2001). Najveći broj osoba alergičnih na kikiriki posjeduje antitijela (IgE) upravo za alergen Ara h 2 koji ujedno izaziva i najozbiljnije alergijske reakcije (Clarke i sur., 1998; Koppelman i sur., 2004). Ostali alergeni kikirikija su Ara h 3 i 4 (proteini glicinina) (Bannon i sur., 2000; Koppelman i sur., 2003), Ara h 5 (profilin), Ara h 6 i 7 (Scurlock i Burks, 2004), i Ara h 8 (Mittag i sur., 2004). Smatra se kako alergenost određenih proteina uvjetuje trodimenzionalna struktura i određene stabilne strukture na koje ne utječu probavni enzimi, a što omogućuje interakciju s IgE antitijelom. Općenito, proteini kikirikija su topljivi glikoproteini male molekulske mase koji pokazuju stabilnost pri visokim temperaturama i kiselim uvjetima te su relativno otporni na proteolitičke enzime (Astwood i sur., 1996), a također većina alergena kikirikija pokazuje otpornost pri tehnološkom procesiranju hrane i stabilnost pri probavljanju (Burks i sur.,

1998). Istraživanja su pokazala da se pečenjem kikirikija povećava alergenost i stabilnost proteina, u odnosu na prženje i kuhanje (Maleki i sur., 2000), pri čemu je zanimljivo da u Kini unatoč konzumaciji kikirikija u velikim količinama ne prevladava alergija na kikiriki u populaciji, a razlog tome možda leži u činjenici da se u Kini kikiriki najčešće kuha ili prži. Beyer i suradnici (2001) određivali su intenzitet vezanja IgE antitijela za Ara h 1, Ara h 2 i Ara h 3 nakon pečenja, prženja i kuhanja kikirikija te je zabilježen pad intenziteta vezanja antitijela za sva tri proteina kikirikija nakon procesa prženja i kuhanja.

Novije tehnologije poput pulsirajućeg ultraljubičastog zračenja, gama zračenja, tretmana proteina s polifenol oksidazom i fenolnim spojevima, te genetičko inženjerstvo pokazuju potencijal u rješavanju problema alergenosti sastojaka kikirikija, međutim potrebna su dodatna klinička istraživanja kako bi ove metode imale praktičnu primjenu (Chung i sur., 2005; Chung i sur., 2008; Dodo i sur., 2008; Lee i sur., 2008).

2.2. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA

Analitičke metode u detekciji nutritivnih alergena dijele se na metode koje koriste humana IgE antitijela, te na metode koje koriste antitijela životinjskog podrijetla (zec, miš, koza, ovca ili kokoš). U prvu skupinu metoda ubrajaju se RAST (engl. *Radio-Allergosorbent Test*) i EAST (engl. *Enzyme-Allergosorbent Test*) metode kojima se određuje razina specifičnih IgE antitijela. SDS-PAGE immunoblot metoda također koristi humana IgE antitijela, te je njome moguće detektirati i okarakterizirati veće ili manje alergene u hrani. Općenito, nedostaci ovakvih metoda su činjenica da humana antitijela variraju prema specifičnosti i osjetljivosti pa je moguća i križna reakcija, a osim toga količina je često limitirana. Antitijela podrijetlom iz životinja koriste se u imunodifuzijskoj metodi, RIE (engl. *Rocket Immunoelectrophoresis*) metodi, dot- immunoblotting, SDS-PAGE immunoblotting metodi i ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodi. Ove metode, uz iznimku imunodifuzijske, koriste se za detekciju, a u nekim slučajevima i kvantifikaciju nutritivnih alergena. Od svih metoda ELISA metoda pokazuje najveći potencijal u detekciji skrivenih alergena u hrani (Besler i sur., 2002). Pri provođenju imunoloških metoda moraju se zadovoljiti neki osnovni kriteriji, pri čemu kritični korak predstavlja priprema uzorka, odnosno dobra ekstrakcija proteina iz matriksa uzorka. Također, osjetljivost metode i limit detekcije moraju zadovoljavati uvjete i omogućiti detekciju alergena u tragovima. Kako bi se izbjegla križna reaktivnost, metoda mora biti specifična, odnosno antitijelo mora biti visokopročišćeno i specifično. Antitijela moraju imati sposobnost detekcije alergena u procesiranoj hrani gdje postoji mogućnost da su takvi

alergeni manje reaktivni, odnosno da su slijedom različitih tretmana pri procesiranju hrane proteini (alergeni) denaturirani. Keck-Gassenmeier i suradnici (1999) su dokazali da je detaljna kontrola kvalitete potrebna i kod korištenja komercijalnih ELISA testova; naime, pokazali su da ekstrakcijska metoda koju je predvidio proizvođač nije bila dostatna za detekciju tragova alergena kikirikija u tamnoj čokoladi. Razlog tome je tanin koji je prisutan u tamnoj čokoladi što je potvrđeno dodatkom riblje želatine pri ekstrakciji koja je, vežući tanine, omogućila otkrivanje tragova kikirikija (Keck-Gassenmeier i sur., 1999).

Osim navedenih metoda, za određivanje alergena u tragovima koriste se i PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) metode. Za razliku od ELISA metoda gdje se detektiraju proteini, PCR metoda služi za detekciju određenog dijela DNA sekvence i na tom principu detektira prisutnost alergena. Često se koristi kao verifikacijska metoda nakon provedene ELISA metode.

2.2.1. Određivanje alergena kikirikija

Posljednjih nekoliko godina koristi se nekoliko metoda za detekciju tragova kikirikija u hrani. Metoda kojom je prvi puta imunološki dokazana prisutnost proteina kikirikija je RIE metoda (Barnettt i Howden, 1984). Ova metoda imala je u početku limit detekcije 30 $mgkg^{-1}$, zatim se razvila do 10 $mgkg^{-1}$. Veliki nedostatak ove metode bila je optimizacija količine antitijela u gelu što je uvelike ovisilo o količini kikirikija u uzorku, zbog čega se eksperiment i provodio (Holzhauser i sur., 1998).

Yunginger i suradnici (1983) proveli su eksperiment detekcije tragova kikirikija u suncokretovom ulju pomoću RAST inhibicije. U šest od osam uzoraka pronađeni su tragovi kikirikija u rasponu od 3 000 do 33 000 $mgkg^{-1}$. Ova metoda razvijena je do limita detekcije 87,5 $mgkg^{-1}$, iako mnogi znanstvenici smatraju da bi ova metoda trebala doseći barem limit od 10 $mgkg^{-1}$.

IgE-immunoblotting metoda se također koristi za detekciju prisutnosti kikirikija u hrani, no zbog limita detekcije od 50 $mgkg^{-1}$, a i zbog komplicirane ekstrakcije nije praktična kao kontrolna metoda tijekom procesa prerade hrane (Schappi i sur., 2001).

Prva ELISA metoda za detekciju tragova kikirikija opisana je u istraživanju Hefle i suradnika (1994), gdje su korištena monoklonska antitijela za određene proteine kikirikija te poliklonska antitijela (antitijela zeca na proteine kikirikija) koja su služila kao detektor. Limit detekcije ove metode iznosio je 40 $mgkg^{-1}$. Rezultati dobiveni prvom ELISA metodom u detekciji proteina kikirikija bili su u korelaciji s rezultatima dobivenim RAST metodom što je potvrdilo

točnost ove metode i otvorilo vrata za naredna istraživanja te unaprijeđenje metode do prihvatljivog limita detekcije (Poms i sur., 2004).

Koppelman i suradnici (1996) su opisali "sendvič" ELISA metodu gdje su korištena poliklonska antitijela (podrijetlom iz zeca) i djelomično pročišćen protein Ara h 1 iz sirovog kikirikija, dok su kao detektor antitijela korištena ista antitijela obilježena peroksidazom. Rezultati su pokazali da je prženi kikiriki nešto manje reaktivan od sirovog, a također metoda nije pokazala križnu reaktivnost s većinom ostalih leguminoza. U 25 ispitivanih uzoraka hrane nije detektirana prisutnost kikirikija (kako sirovog, tako i prženog); limit detekcije iznosio je 0,1 $mgkg^{-1}$.

Pomes i suradnici (2003) su određivali udio alergena kikirikija (Ara h 1) ELISA metodom u 83 različita prehrambena proizvoda te je utvrđeno da se udio alergena kretao u rasponu od 0,1 do 500 μgg^{-1}. Time je potvrđeno da se ova metoda može koristiti za praćenje eventualne kontaminacije alergenom Ara h 1 tijekom procesa proizvodnje te za određivanje praga (0,2 mg) pri kojem dolazi do senzibilizacije u osoba s alergijom na kikiriki. Peng i suradnici (2013) poboljšanjem metode snizili su granicu detekcije alergena Ara h 1 na 0,34 $ngmL^{-1}$.

2.3. ELISA METODA

2.3.1. Primjena ELISA metode u analitici hrane

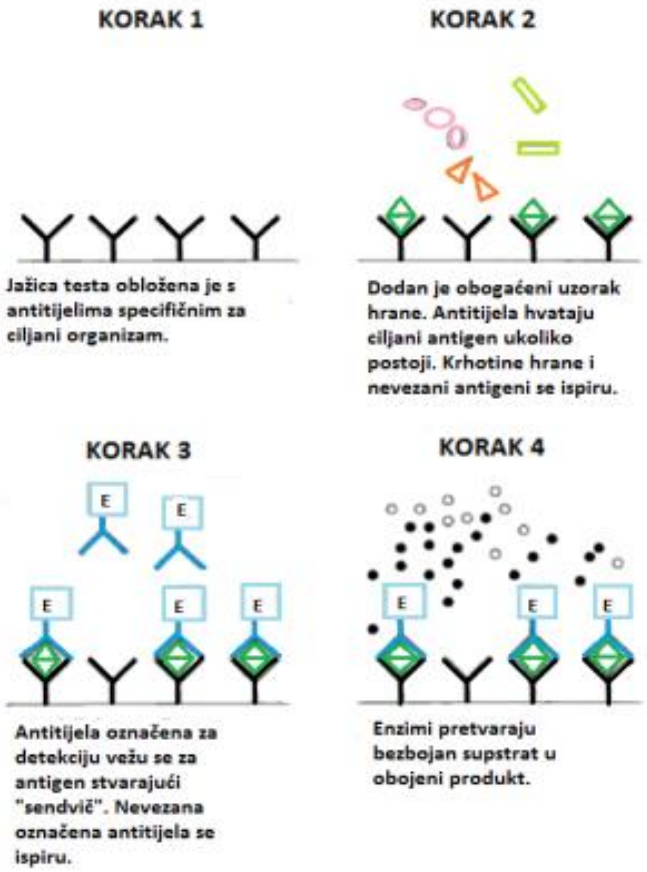
Imunoenzimske metode poput ELISA testa razvile su se u svrhu kontrole kvalitete hrane, posebice sirovina u preradi hrane. Sedamdesetih godina prošloga stoljeća počele su se intenzivnije koristiti za detekciju podrijetla hrane i kontaminaciju lijekovima (Allen i Smith, 1987). Nešto kasnije počele su se upotrebljavati za detekciju antibiotika u kravljem mlijeku u sirnoj industriji te za otkrivanje patvorenja kod mljevenog mesa (Ayob i Smith, 1990). Kasnije se upotreba proširila na alergene (Immer i sur., 2004), hormone (Johansson i Hellenas, 2004), ostatke lijekova (Myrtazina i sur., 2004), pesticide (Bonwick i sur., 1996), vitamine (Indyk i sur., 2000), mikotoksine (Smith i sur., 1990) i patogene (de Boer i Beumer, 1999). Wang i suradnici (2009) su proveli istraživanje u kojem su razvili ELISA test za detekciju tragova neomicina u svinjskom i kokošjem mesu, jajima, mlijeku i ribi. Rezultate dobivene ELISA testom su usporedili s rezultatima HPLC (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*) analize, te su potvrdili korelaciju rezultata, a osim toga ekstrakcijska procedura za uzorak je jednostavnija kod ELISA testa nego kod HPLC analize. Zaključili su da je ELISA test pouzdana metoda za detekciju tragova neomicina u hrani životinjskog

podrijetla. Hennion i Barcelo (1998) su proveli istraživanje u kojem su ELISA testom detektirali pesticide u uzorcima vode, te su ispitivali parametre metode kako bi istaknuli prednosti i nedostatke ovakvih metoda naspram tradicionalnih metoda za detekciju pesticida. Ustanovili su da je zbog lažno pozitivnih rezultata kod ELISA metode potrebno napraviti i potvrdnu metodu, a prednost je jednostavnost metode, niski troškovi i brzi rezultati. Chu i suradnici (2010) su ispitivali efikasnost analitičkih tehnika pri određivanju melamina u hrani za životinje i mlijeku. Najpouzdanijom metodom pokazala se kombinacija kromatografije i masene spektrometrije, međutim preporuka autora je da kao alternativu toj metodi laboratoriji koriste komercijalne ELISA testove specifične za melamin jer su pokazali zadovoljavajuće rezultate u analizi hrane za životinje i mlijeka. Zhang i Wang (2009) su istraživali različite ELISA testove za detekciju tragova sulfonamida u hrani životinjskog podrijetla. Otkrili su da je limitirajući faktor odabir antitijela jer se sulfonamidi vežu široki spektar antitijela stoga postoji opasnost od križne reakcije.

2.3.2. ELISA metoda u određivanju alergena

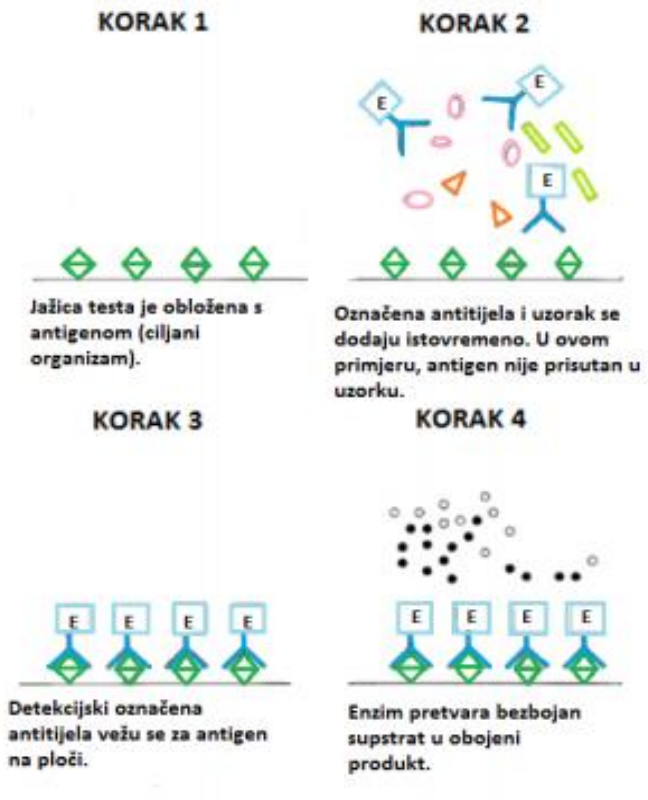
ELISA metoda predstavlja jednu od imunoloških metoda koja koristi enzimom obilježena antitijela za detekciju antigena, odnosno alergena, pri čemu enzim u osnovi služi za promjenu boje (stvaranje produkta određene boje) što ukazuje na postojanje antigen- antitijelo kompleksa. Osim za određivanje alergena u prehrambenoj industriji, ova metoda se koristi i za određivanje pesticida, mikotoksina, patogena i dr. Postoji nekoliko vrsta ELISA tehnika: indirektna, "sendvič", konkurentna te nova višestruka prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča. Najviše se u određivanju alergena koriste "sendvič" i konkurentna ELISA tehnike.

"Sendvič" ELISA (Slika 2) je osjetljivi test kojim je moguće detektirati i kvantitativno odrediti specifične proteine, a razlog tome je što antitijela najčešće posjeduju dva ili više različita epitopa kojima se vežu na antigen. Najjednostavnija "sendvič" ELISA koristi visokopročišćena, specifična antitijela koja su imobilizirana na nosaču (plastičnim mikrojažicama). Nakon dodavanja uzorka u mikrojažice, imobilizirana antitijela specifično vežu antigen ako je prisutan u uzorku te se ostatak otopine uzorka ispire iz mikrojažice, a dodatkom enzimom obilježenog antitijela dolazi do detekcije nastalog antitijelo-antigen kompleksa koji se očituje kao promjena boje uslijed djelovanja enzima i kromogenog supstrata. Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski na određenoj valnoj duljini, a vrijedi pravilo da je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji antigena.



Slika 2. Princip "sendvič" ELISA testa (Anonymous 1, 2016)

Konkurentna ELISA metoda (Slika 3) koristi tehniku jednog epitopa za prepoznavanje antigena (tragova alergena u uzorku), naime u ovom slučaju je antigen u tankom sloju imobiliziran na nosač (mikrojažice), dodavanjem određene količine primarnog antitijela i slobodnog antigena (uzorka) stvara se kompeticija između slobodnog (uzorak) i vezanog antigena na stvaranje kompleksa s antitijelom. Nakon ispiranja nevezanog antigena, dodaje se sekundarno antitijelo obilježeno enzimom koje prepoznaje nastali antigen- antitijelo kompleks te dodatkom supstrata dolazi do promjene boje. U ovom slučaju intenzitet promjene boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji antigena (alergena).



Slika 3. Princip konkurentnog ELISA testa (Anonymous 2, 2016)

Prednosti ELISA metode: jednostavna, brza metoda, moguća automatizacija; koristi standardizirani format od 96 jažica; osjetljivost ($mgkg^{-1}$); selektivnost; dostupnost reagensa; brzi povrat informacija; niski kapitalni troškovi; prenosivost.
Nedostaci: duže razvojno vrijeme; moguća križna reaktivnost; efekt matriksa; mogućnost lažno pozitivnih rezultata; potrebna potvrdna metoda; nemogućnost analize više tragova alergena odjednom; otežan uvid problema ako nije osigurana kvaliteta testa (Hefle, 2006).

Zagon i suradnici (2015) su u sklopu francuskog istraživačkog projekta "Mirabel" istraživali tragove proteina kikirikija u 899 uzoraka pakirane hrane koja ne sadrži kikiriki, a uzorci su podijeljeni u deset prehrambenih kategorija. Metodologija je obuhvaćala slijed od više detekcijskih metoda. U prvom koraku je korištena imunokromatografska metoda (engl. *Lateral Flow Assay*) s limitom detekcije od 2 $mgkg^{-1}$ kikirikija ili 0,5 $mgkg^{-1}$ proteina kikirikija. Pozitivno je bilo 139 uzoraka, a rezultat je potvrđen real-time PCR metodom s istom osjetljivošću. Uzorci koji su bili pozitivni u obje metode, podvrgnuti su kvantifikaciji pomoću dva različita komercijalna ELISA testa. U 9 od ukupno 899 uzoraka utvrđeni su mjerljivi tragovi kikirikija (iznad limita detekcije). U 6 uzoraka određeni su proteini kikirikija

u koncentraciji ispod 5 $mgkg^{-1}$. Kod 2 uzorka koncentracija proteina kikirikija iznosila je između 8 do 10 $mgkg^{-1}$, a u jednom uzorku utvrđena je maksimalna koncentracija od 20 $mgkg^{-1}$. Ovim istraživanjem omogućena je detekcija alergena i u koncentracijama od 2 $mgkg^{-1}$ (Zagon i sur., 2015).

Elegbede i suradnici (2015) su u sklopu projekta "Mirabel" razvili metodu za optimizaciju veličine uzoraka u sustavu kontrole i monitoringa alergena. Istraživanjem osobina osoba s nutritivnim alergijama i provođenjem upitnika o njihovim navikama, izabrano je osam kategorija prehrambenih proizvoda među kojima određeni broj proizvoda s navodom upozorenja o mogućoj prisutnosti tragova kikirikija te određeni broj bez takvog navoda. Većinu ispitanih činili su djeca (< 12 godina) te je izbor kategorija namirnica bio sukladan njihovim prehrambenim navikama (poput kruha, pekarskih proizvoda, čokolada, krem namaza, sladoleda i sl.). Istraživanje je pokazalo da je u kategoriji čokolada i krem proizvoda veća vjerojatnost određivanja tragova kikirikija u proizvodima bez upozorenja nego u proizvodima s upozorenjem na deklaraciji. Također, vjerojatnost određivanja tragova kikirikija u kategoriji žitarica za doručak veća je u proizvodima bez upozorenja (44 %) u usporedbi s onima koji imaju upozorenje (16 %). Jedan od mogućih razloga ovakve situacije je pretjerano korištenje općih navoda o mogućim tragovima alergena od strane proizvođača koji stavljaju navode predostrožnosti radi, bez isticanja koncentracije alergena. Naime, unutar pojedinih kategorija prehrambenih proizvoda koncentracija alergena kikirikija obuhvaća široki raspon koji, primjerice za čokoladne proizvode, iznosi od 2,5 $mgkg^{-1}$ do 61 $mgkg^{-1}$. Ovim istraživanjem predložena je metodologija optimizacije uzoraka za procjenu rizika skrivenih alergena, koja se preporuča kao jedan od alata za monitoring tragova alergena od strane nadležnih tijela (Elegbede i sur., 2015).

2.4. ALERGENI I ZAKONSKA REGULATIVA

Unutar Pravilnika o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane (Pravilnik, 2011) bili su navedeni sastojci koji mogu izazvati alergije i/ili intolerancije: 1. žitarice koje sadrže gluten (pšenica, raž, ječam, zob, pir, kamut ili njihovi hibridi) i proizvodi žitarica; 2. rakovi i proizvodi od rakova; 3. školjkaši i ostali mekušci te proizvodi od njih; 4. jaja i proizvodi od jaja; 5. proizvodi ribarstva; 6. kikiriki i proizvodi od kikirikija; 7. soja i proizvodi od soje; 8. lupina i proizvodi od lupine; 9. mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući i laktozu); 10. orašasti plodovi (badem *Amygdalus communis L.*, lješnjak *Corylus avellana,* orah *Juglans*

regia, indijski oraščić-kešu *Anacardium occindetale,* pekan oraščić *Carya illinoiesis*, brazilski oraščić *Bertholletia excelsa,* pistacija *Pistacia vera*, makadamija oraščić *Macadamia ternifolia*) i njihovi proizvodi; 11. celer i proizvodi od celera; 12. gorušica i proizvodi od gorušice. Navedene kategorije sastojaka obavezno je bilo naglasiti na deklaraciji na način da su podebljani, podcrtani ili na neki drugi način istaknuti. Također veličina slova na deklaraciji određena je na minimalno 1,2 milimetra. Međutim ono što nije bilo regulirano ovim pravilnikom su navodi o mogućim tragovima alergena, niti su definirani izrazi koji se koriste na deklaraciji, a koje subjekti u poslovanju hranom (koji stavljaju proizvod na tržište) proizvoljno stavljaju na deklaracije.

Od dana ulaska u Eropsku uniju u Republici Hrvatskoj na snazi je zakon (Zakon, 2015) koji je sukladan Uredbi (EU) br.178/2002. Unutar toga zakona definirani su termini i izrazi te navedene obaveze subjekta u poslovanju hranom vezane uz deklaracije i označavanje hrane.
Prema Uredbi (EU) 1169/2011 deklaracija zapakirane hrane mora sadržavati sljedeće podatke: (a) naziv hrane; (b) popis sastojaka; (c) popis svih sastojaka ili pomoćnih tvari u postupku proizvodnje koji su navedeni u Prilogu II. ili dobiveni od tvari ili proizvoda iz Priloga II. koji uzrokuju alergije ili intolerancije, a koji su upotrijebljeni u postupku proizvodnje ili pripreme hrane i koji su prisutni u gotovom proizvodi, čak i u izmijenjenom obliku; (d) količina određenih sastojaka ili kategorija sastojaka; (e) neto količina hrane; (f) datum minimalne trajnosti ili „upotrijebiti do" datum; (g) uvjeti skladištenja i/ili upotrebe; (h) naziv tvrtke i adresa subjekta u poslovanju hranom koji je odgovoran za informacije odnosno podatke o hrani; (i) zemlja ili mjesto podrijetla; (j) upute za upotrebu ako jednostavna upotreba hrane nije moguća bez uputa; (k) stvarna alkoholnu jakost, za pića koja sadrže više od 1,2 % vol. alkohola; (l) nutritivna deklaracija.
RASFF (engl. *Rapid Alert System for Food and Feed)* je organizacija koja djeluje na području Europe, a ima za cilj uspostaviti sustav brzog uzbunjivanja, razmjene informacija i opoziva hrane za ljude i hrane za životinje kada se ustanovi da je nepogodna za konzumaciju odnosno nepovoljna za zdravlje potrošača. Bazira se na brzoj izmjeni informacija, obaviještavanju potrošača o povlačenju proizvoda sa tržišta i povrata potencijalno opasne robe putem sljedivosti od proizvođača, prerađivača i subjekata u poslovanju s hranom koji robu stavljaju na tržište. Jedan od segmenata kojim se bavi je i prisutnost alergena u hrani. U godišnjem izvješću za 2015. godinu dan je prikaz o slučajevima vezanim uz nedeklarirane alergene u kojem je vidljivo da je kikiriki četvrti po učestalosti (uz soju i gluten), dok je na prvom mjestu mlijeko, zatim sulfiti te jaja. RASFF sustav dijeli informacije u nekoliko kategorija, od kojih

kategorija "alert" označava hitnu informaciju. U izvješću stoji da je za alergene sveukupno bilo 137 slučajeva od kojih je 114 bilo u kategoriji "alert". Samo su slučajevi patogenih mikroorganizama pretekli alergene što pokazuje da se na području Europe unatoč regulativama i mjerama sigurnosti hrane vrlo često pojavljuju proizvodi s nedeklariranim alergenima. Republika Hrvatska je pristupom Europskoj uniji 2013. godine automatski ušla u RASFF sustav brzog uzbunjivanja u kojoj djeluje nacionalnom kontaktnom točkom HR RASFF, a unutar nje je nekoliko kontaktnih točaka (Uprava za sanitarnu inspekciju, Uprava za veterinarske inspekcije, Uprava poljoprivredne i fitosanitarne inspekcije, Državni inspektorat, Hrvatska agencija za hranu, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Hrvatski veterinarski institut). Od pristupa bilježi porast prijavljenih slučajeva što je pokazatelj da se u Hrvatskoj podiže svijest o sigurnosti hrane. Navedene kontaktne točke predstavljaju nadležna tijela koja u slučaju opoziva robe ili epidemije veće krize, obavještavaju javnost o mjerama koje se poduzimaju u takvom slučaju, a osim toga u svojim laboratorijima provode kontrolna ispitivanja za svu hranu i hranu za životinje dostupnu na tržištu Republike Hrvatske (RASFF, 2016).

Institucija odgovorna za donošenje zakona vezanih uz hranu na području Sjedinjenih Američkih Država je FDA (engl. *Food and Drug Administration*). Prema uputama za označavanje i reklamiranje hrane, FDA navodi osam kategorija izvora alergena koji predstavljaju 90 % svih nutritivnih alergija. To su: 1. mlijeko; 2. jaja; 3. riba; 4. rakovi; 5. orašasti plodovi; 6. pšenica; 7. kikiriki; 8. soja. Ukoliko proizvod sadrži neki od izvora alergena, potrebno je nakon popisa sastojaka navesti alergene pojmom "sadrži" (engl. *Contain*) te navesti sve alergene iz osam kategorija izvora alergena koje dotični proizvod sadrži. Kada je riječ o skrivenim alergenima, odnosno alergenima koji se mogu pojaviti u tragovima, najčešće se koriste izrazi poput: "Može sadržavati alergen ", "Proizvedeno na opremi gdje se koristi alergen ", "Proizvedeno u tvornici u kojoj se koristi alergen". Kao i na području Europske unije, i u SAD-u su ovakvi navodi na deklaracijama proizvoljni te nisu definirani pravilnicima zbog čega se pojavljuju u različitim oblicima i variraju ovisno o proizvođaču.

Hefle i suradnici (2007) proveli su istraživanje na području SAD-a gdje su ispitivali stav i ponašanje potrošača vezanih uz navode o prisutnosti tragova kikirikija na deklaraciji pakirane hrane, a usporedno su istražili i prisutnost tragova kikirikija u pakiranim proizvodima koji su sadržavali upozorenje na deklaraciji. Cilj istraživanja bio je utvrditi razinu razumijevanja

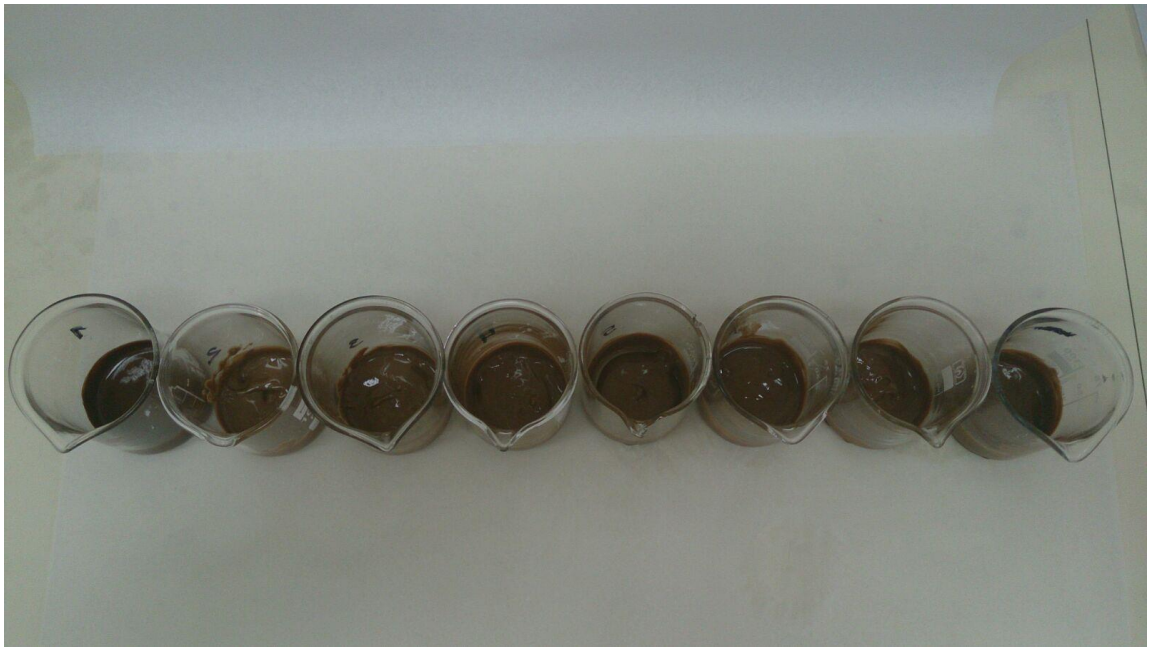
navoda na deklaraciji od strane potrošača, odnosno razinu ignoriranja od strane osoba s alergijama na hranu. Anketirano je 625 osoba s nutritivnim alergijama tijekom 2003. godine te 645 osoba s nutritivnim alergijama tijekom 2006. godine. Rezultati pokazuju kako ispitanici iz 2006. godine manje obraćaju pažnju na navode o mogućoj prisutnosti kikirikija nego oni iz 2003. godine, odnosno tijekom godina potrošači s alergijama na hranu sve više ignoriraju takve navode. Od 200 analiziranih, pakiranih proizvoda s navodom na deklaraciji, proteini kikirikija utvrđeni su u njih 20, između kojih je klinički značajnija količina (>1 mg kikirikija, >0,25 mg proteina kikirikija) određena u 13 uzoraka. Razlogom porasta ignoriranja upozorenja na deklaraciji smatra se posljedica povećane upotrebe takvih navoda od strane proizvođača posljednjih nekoliko godina što izaziva frustraciju osoba s nutritivnim alergijama pri odabiru namirnica pri čemu oni sve više riskiraju te konzumiraju proizvode s upozorenjima. Istraživanje navodi osam najčešćih navoda na deklaracijama te je istražena percepcija potrošača s nutritivnim alergijama, a dobiveni rezultati upućuju na zaključak da navod "može sadržavati alergen" najviše odbija osobe s nutritivnim alergijama, za razliku od navoda poput "proizvedeno u tvornici u kojoj se koristi alergen" ili "proizvedeno na opremi gdje se koristi alergen " koji su međusobno podjednako (ne)učinkoviti (Hefle i sur., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja analizirano je osam uzoraka čokolade s lješnjakom različitih proizvođača te osam uzoraka krem proizvoda različitih proizvođača. Uzorci su označeni rednim brojevima od 1 do 8. Prije ekstrakcije, reprezentativni dio svakog od uzorka ručno je homogeniziran u staklenoj čaši pomoću staklenog štapića (Slika 4).



Slika 4. Homogenizirani uzorci čokolade

3.1.2. Ispitanici

U svrhu prikupljanja stavova potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije, odnosno o prisutnosti tragova kikirikija u čokoladama i krem proizvodima proveden je upitnik (Prilog 1) na uzorku od 93 ispitanika starijih od 18 godina na području grada Zagreba.

3.1.3. Kemikalije

Korišteni su sljedeći reagensi iz seta za ELISA test (Slika 5):

- AgraQuant- Peanut Enzyme, Romer Labs, Austrija
- AgraQuant- Substrate, Romer Labs, Austrija
- AgraQuant- Stop Solution, Romer Labs, Austrija
- AgraQuant, Peanut, Extraction & Sample Dilution Buffer, Romer Labs, Austrija (ekstrakcijski pufer)
- AgraQuant, Peanut, Wash Buffer, Romer Labs, Austrija (pufer za ispiranje).



Slika 5. Reagensi iz seta za ELISA test

3.1.4. Laboratorijska oprema i pribor

Tijekom istraživanja korišteni su sljedeći uređaji:

- ELISA *Microplate reader* s uključenim računalnim programom Gen 5, Bio Tek Instruments, SAD (Slika 6)
- analitička vaga, YMC Chyo, tip JK-180 Mikrotehna, Zagreb
- vorteks, VWR, tip VV3
- vodena kupelj, INKO, Zagreb
- centrifuga, Rotofix 32A, Hettich, Njemačka (Slika 7).



Slika 6. ELISA *Microplate reader*



Slika 7. Centrifuga

Korišteno je sljedeće posuđe i pribor:

- automatska pipeta
- nosač za mikrojažice, AgraQuant, Romer Labs, Austrija
- odmjerna tikvica od 200 mL
- odmjerna tikvica od 10 mL
- pipeta od 10 mL
- pipeta od 1 mL
- nastavak za pipetu
- staklene čaše od 100 mL
- staklene čaše od 250 mL
- stakleni štapić

- metalna žličica
- plastične epruvete
- metalni stalak za epruvete
- staničevina
- stakleni ljevak
- filter papir.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema reakcijskih otopina

Koncentrat ekstrakcijskog pufera iz seta za ELISA test razrijeđen je destiliranom vodom u omjeru 1:10, odnosno otpipetirano je 20 mL koncentrata ekstrakcijskog pufera u tikvicu od 200 mL koja je nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Razrjeđeni ekstrakcijski pufer čuvan je pri 4 °C.

Koncentrat pufera za ispiranje iz seta za ELISA test razrijeđen je destiliranom vodom u omjeru 1:10, odnosno otpipetiran je 1 mL koncentrata za ispiranje u tikvicu od 10 mL te je tikvica napodunjena destiliranom vodom do oznake. Razrjeđeni pufer za ispiranje čuvan je pri 4 °C.

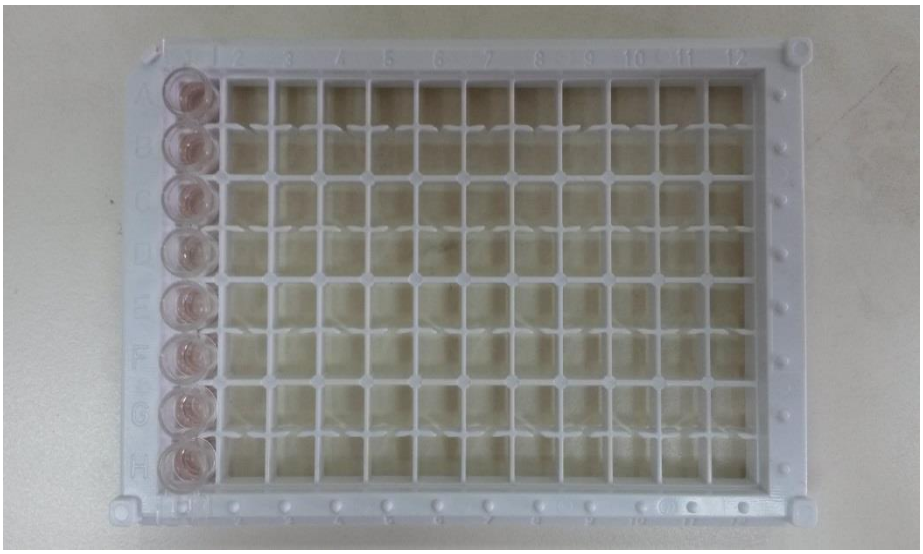
3.2.2. Ekstrakcija uzoraka

Na analitičkoj vazi izvagan je 1 g homogeniziranog uzorka u plastičnoj epruveti. Pomoću automatske pipete, u plastičnu epruvetu s uzorkom dodano je 20 mL razrjeđenog ekstrakcijskog pufera. Sadržaj je vorteksiran dok uzorak nije u potpunosti otopljen u ekstrakcijskom puferu. Zatim je suspenzija inkubirana u prethodno zagrijanoj vodenoj kupelji pri 60 °C kroz petnaest minuta uz snažno protresanje svake dvije minute. Nakon inkubacije, suspenzija je podvrgnuta centrifugiranju na 2 000 okretaja/min u periodu od deset minuta. Dobiveni supernatant nakon centrifugiranja je, zbog prisutnih čestica, filtriran kroz filter papir. Sakupljeni filtrat je predstavljao pročišćeni uzorak spreman za nanošenje na mikrojažice.

3.2.3. ELISA test

Princip

Korišteni AgraQuant kikiriki test obzirom na princip predstavlja "sendvič" ELISA test. Proteini kikirikija se ekstrahiraju iz uzorka pomoću ekstrakcijskog pufera, a primarna antitijela su u tankom sloju nanesena na površinu mikrojažica. Nanošenjem ekstrahiranih uzoraka (ili standarda) u mikrojažice, dolazi do vezanja proteina kikirikija i antitijela. Nakon koraka ispiranja u mikrojažice se dodaje enzimom obilježeno sekundarno antitijelo te određeno vrijeme inkubira. Zatim slijedi korak ispiranja i dodavanje supstrata za enzim pri čemu se razvija plava boja. Intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji proteina kikirikija u uzorku (ili standardu). Nakon određenog vremena u mikrojažice se dodaje "stop" otopina pri čemu plavo obojenje prelazi u žuto. Obojenje se mjeri spektrofotometrijski pri 450 nm, rezultati se uspoređuju s baždarnom krivuljom te se dobivaju koncentracije proteina kikirikija u uzorku.

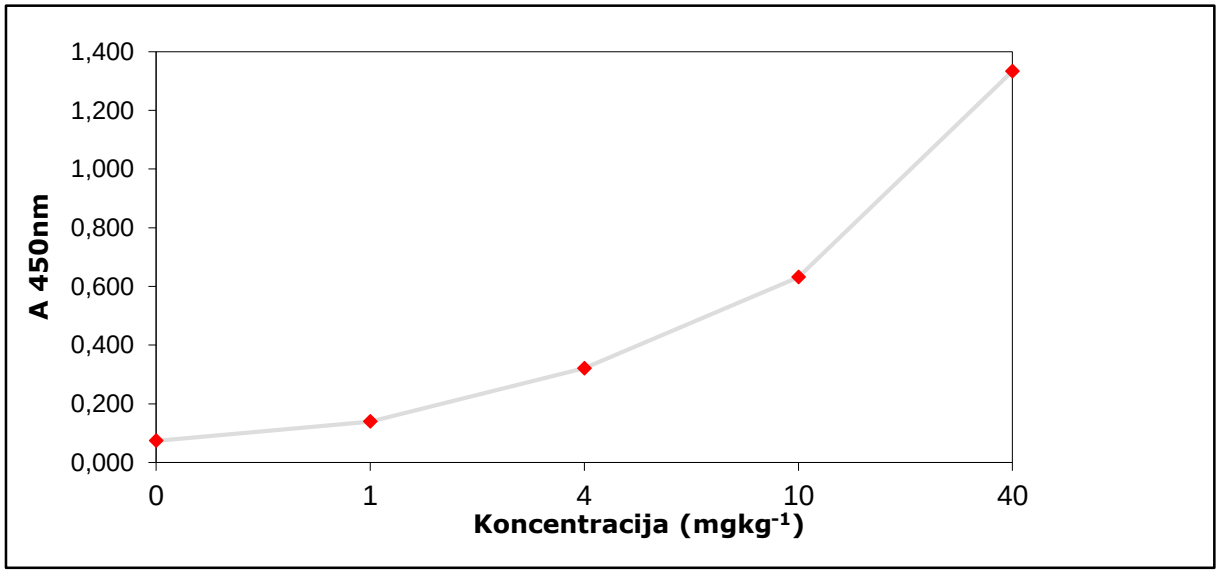


Slika 8. Nosač s mikrojažicama

Na držač je postavljeno osam mikrojažica obloženih antitijelom iz seta za ELISA test (slika 8). Pomoću jednokanalne automatske pipete dodano je 100 µL pripremljenog ekstrakta uzorka u svaku pojedinu jažicu te su jažice inkubirane pri sobnoj temperaturi dvadeset minuta. Nakon inkubacije, sadržaj jažica je ispražnjen u otpadni spremnik okretanjem držača s mikrojažicama naopako. Sadržaj svake mikrojažice je ispran puferom za ispiranje, nakon čega

je sadržaj bačen u otpadni spremnik, a taj je postupak ponovljen četiri puta pri čemu je u konačnici svaka mikrojažica isprana pet puta. Za pražnjenje sadržaja mikrojažica korištena je staničevina. Nakon petog ispiranja mikrojažice su dobro prosušene lupkanjem o staničevinu do trenutka nestanka posljednjih mjehurića zraka. U svaku jažicu je otpipetirano 100 µL reagensa koji sadrži antitijela konjugirana enzimima te su mikrojažice inkubirane pri sobnoj temperaturi dvadeset minuta. Tijekom inkubacije posebna pažnja je usmjerena na nepomicanje držača mikrojažica kako ne bi došlo do kontaminacije iz jedne jažice u drugu. Nakon dvadeset minuta sadržaj mikrojažica je ispražnjen u otpadni spremnik te je svaka mikrojažica isprana pet puta puferom za ispiranje, identično prethodnom koraku ispiranja mikrojažica. Nakon dobrog prosušivanja mikrojažica i uklanjanja eventualnih mjehurića zraka, u svaku mikrojažicu je otpipetirano 100 µL reagensa koji sadrži supstrat za enzim, nakon čega je slijedila inkubacija u tami u periodu od dvadeset minuta. Nakon inkubacije u tami, otpipetirano je 100 µL „stop“ otopine u svaku mikrojažicu pri čemu je uslijedila promjena boje iz plave u žutu.

Držač s mikrojažicama (Slika 8) je pažljivo prenešen do čitača s filterom od 450 nm, postavljen na predviđeno mjesto te je pokrenut računalni program za očitavanje apsorbancije. Koncentracija kikirikija u svakom od analiziranih uzoraka čokolade s lješnjakom i krem proizvoda, određena je na osnovu prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda kirikija (Slika 9) pri čemu su koncentracije otopina standarda iznosile 0, 1, 4, 10 i 40 $mgkg^{-1}$.



Slika 9. Baždarni dijagram standarda kikirikija

3.2.4. Ispitivanje stavova potrošača o kikirikiju i proizvodima koji uzrokuju alergije

U svrhu prikupljanja stavova i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije, odnosno o prisutnosti tragova kikirikija u čokoladama i krem proizvodima proveden je upitnik na uzorku od 93 ispitanika starijih od 18 godina na području grada Zagreba. Uzorak je reprezentativan po spolu, te je upitnik provođen tijekom srpnja i kolovoza 2016. godine. Cilj upitnika bio je dobiti uvid u stavove potrošača vezano za čitanje deklaracija; asocijacije na izraze s deklaracija vezano uz prisutnost alergena; razumijevanje deklariranog; percepciju sigurnosti hrane; povjerenje prema proizvođačima. Upitnik se sastoji od 10 pitanja od kojih tri predstavljaju pitanja vezana uz socio-demografske karakteristike ispitanika, a ostala pitanja su usko vezana uz prethodno opisanu tematiku. Pitanja su zatvorenog tipa, četiri s dihotomnim odgovorima (da-ne); dva pitanja intenziteta s numeričkom skalom raspona od jedan do pet; jedno pitanje s ponuđenim odgovorima (Kukić i Markić, 2006). Primjer upitnika nalazi se u prilozima (Prilog 1).

3.2.5. Obrada podataka

ANOVA test proveden je u svrhu utvrđivanja značajnosti utjecaja dobivenih vrijednosti. Dobiveni rezultati analizirani su pomoću Microsoft Excel 2013 programa. Za prikaz rezultata korištene su standardne metode deskriptivne statistike ($\bar{X}$ - srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, udio ispitanika (%)). U svim statističkim analizama rezultati su bili statistički značajni ako je $p<0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja ELISA testom određen je udio potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima krem proizvoda te uzorcima čokolade s lješnjakom. Također, ispitani su stavovi potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Rezultati određivanja udjela potencijalnih alergena kikirikija ($mgkg^{-1}$) prikazani su u tablicama 1 i 3. Stavovi potrošača, prikupljeni putem upitnika, prikazani su grafički na slikama 10-14.

4.1. UDIO POTENCIJALNIH ALERGENA KIKIRIKIJA ODREĐEN ELISA TESTOM U UZORCIMA ČOKOLADA I KREM PROIZVODA

Tijekom ovog istraživanja proveden je ELISA test kojim je kvantitativno određena prisutnost alergena kikirikija u uzorcima čokolada s lješnjakom i krem proizvoda. Set za ELISA test AgraQuant Peanut Assay nabavljen je od proizvođača Romer Labs, Austrija. Limit detekcije ELISA testa iznosi 0,10 $mgkg^{-1}$. Izmjerena koncentracija alergena kikirikija izražena je u $mgkg^{-1}$.

Također, usporedno s rezultatima ELISA testa, tablično su prikazani navodi s deklaracija pripadajućih analiziranih proizvoda koji su neposredno vezani uz eventualnu prisutnost alergena kikirikija.

Rezultati određivanja (tablica 1) prikazuju prisutnost alergena kikirikija u svih osam krem proizvoda koji su analizirani ELISA testom. Udio alergena kikirikija u analiziranim uzorcima krem proizvoda kreće se u rasponu od 0,27 do 3,90 $mgkg^{-1}$, prosječno 1,10 $mgkg^{-1}$.

Tablica 1. Udio ($mgkg^{-1}$) alergena kikirikija u uzorcima (n=8) krem proizvoda

Uzorak	**Udio alergena kikirikija[$mgkg^{-1}$]*** (srednja vrijednost ± SD)
Krem proizvod 1	0,53 ± 0,015
Krem proizvod 2	0,27 ± 0,010
Krem proizvod 3	0,29 ± 0,000
Krem proizvod 4	0,35 ± 0,000
Krem proizvod 5	1,23 ± 0,025
Krem proizvod 6	0,42 ± 0,000
Krem proizvod 7	1,81 ± 0,015
Krem proizvod 8	3,90 ± 0,020

*ne postoji statistički značajna razlika između uzoraka analiziranih ELISA metodom ($p>0,05$)

Najviša koncentracija alergena kikirikija (3,90 $mgkg^{-1}$) određena je u uzorku „Krem proizvod 8“, koji ujedno predstavlja i jedini krem proizvod među analiziranima koji, kao što je prikazano u tablici 2, sadrži navod o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija. Ostali proizvodi ne sadrže navode o prisutnosti kikirikija unatoč tome što je ovim istraživanjem potvrđena njihova prisutnost.

Tablica 2. Navodi na deklaraciji analiziranih krem proizvoda vezani uz prisutnost alergena kikirikija

Uzorak	**Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena kikirikija**
Krem proizvod 1	(nema navoda)
Krem proizvod 2	(nema navoda)
Krem proizvod 3	(nema navoda)
Krem proizvod 4	(nema navoda)
Krem proizvod 5	(nema navoda)
Krem proizvod 6	(nema navoda)
Krem proizvod 7	(nema navoda)
Krem proizvod 8	„Proizvedeno u tvornici u kojoj se upotrebljavaju proizvodi od žitarica (pšenica) i kikiriki.“

Trenutno komercijalno dostupni ELISA testovi za detekciju alergena kikirikija bazirani su na poliklonskim antitijelima za Ara h1 protein (Schubert-Ullrich i sur., 2009). Ara h 1 protein je optimalan antigen u testovima za detekciju tragova kikirikija (Pomes i sur., 2003), a ubraja se u skupinu vicilina odnosno proteina sjemenki stoga je sličan drugim proteinima u leguminozama (grah, grašak, soja). Zbog te sličnosti moguća je križna reaktivnost antitijela i proteina drugih leguminoza (Schubert-Ullrich i sur., 2009) pa su mogući lažno pozitivni rezultati. Istraživanja su pokazala da je minimalna doza koja izaziva alergijsku reakciju oko 4 do 5 mg kikirikija, međutim i manje koncentracije izazivaju kod predisponiranih pojedinaca osip i subjektivan osjećaj alergijske reakcije. Rezultati određivanja alergena kikirikija ELISA testom za krem proizvode ukazuju na koncentracije kikirikija ispod navedene minimalne doze, iako "Krem proizvod 8" ima detektiranu koncentraciju (3,90 $mgkg^{-1}$) blizu minimalne koncentracije koja teoretski može izazvati alergijsku reakciju.

Prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani, subjekt u poslovanju s hranom odgovoran za označavanje hrane mora obavezno označiti alergene u popisu sastojaka, međutim u ovom slučaju analizirani proizvodi ne sadrže kikiriki kao sastojak, te zbog toga subjekti u poslovanju hranom nisu obavezni označavati opasnost od alergena kikirikija. Kao što je prikazano u tablici 2, samo jedan od osam krem proizvoda sadrži navedeni navod. S obzirom da svu odgovornost preuzima subjekt u poslovanju s hranom koji je naveden na ambalaži, proizvoljna je odluka o navođenju odnosno ne navođenju potencijalnih alergena u tragovima.

Iz rezultata određivanja potencijalnih alergena kikirikija ELISA testom prikazanih u tablici 3 vidljiva je prisutnost alergena kikirikija u sedam od ukupno osam analiziranih uzoraka čokolade s lješnjakom. U uzorku „Čokolada 1“ nije potvrđena prisutnost alergena kikirikija obzirom da je određena koncentracija ispod limita detekcije (<LOD- engl. *Limit Of Detection*). Limit detekcije za korištenu ELISA metodu iznosi 0,10 $mgkg^{-1}$. Udio potencijalnih alergena kikirikija u osam analiziranih uzoraka čokolade s lješnjakom kreće se u rasponu od 0,27 do 4,05 $mgkg^{-1}$, prosječno 0,96 $mgkg^{-1}$.

Tablica 3. Udio ($mgkg^{-1}$) alergena kikirikija u uzorcima (n=8) čokolade s lješnjakom

Uzorak	**Udio alergena kikirikija[$mgkg^{-1}$]*** (srednja vrijednost ± SD)
Čokolada 1	<LOD**
Čokolada 2	0,69 ± 0,000
Čokolada 3	0,27 ± 0,010
Čokolada 4	0,29 ± 0,005
Čokolada 5	0,42 ± 0,015
Čokolada 6	4,05 ± 0,030
Čokolada 7	0,35 ± 0,000
Čokolada 8	0,66 ± 0,005

*ne postoji statistički značajna razlika između uzoraka analiziranih ELISA metodom (p>0,05)

**limit detekcije (eng. Limit Of Detection)

Tablica 4. Navodi na deklaraciji analiziranih uzoraka čokolade s lješnjakom vezani uz prisutnost alergena kikirikija

Uzorak	**Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena kikirikija**
Čokolada 1	„Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova.“
Čokolada 2	„Može sadržavati tragove kikirikija, ostalih orašastih plodova, glutena i jaja.“
Čokolada 3	„Može sadržavati drugo orašasto voće/plodove i pšenicu.“
Čokolada 4	„Može sadržavati badem, kikiriki, bjelanjak jajeta i gluten u tragovima.“
Čokolada 5	„Može sadržavati bademe, kikiriki, gluten.“
Čokolada 6	„Može sadržavati badem, kikiriki, bjelanjak jajeta i gluten u tragovima.“
Čokolada 7	„Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova.“
Čokolada 8	„Može sadržavati tragove kikirikija, ostalih orašastih plodova, glutena i jaja.“

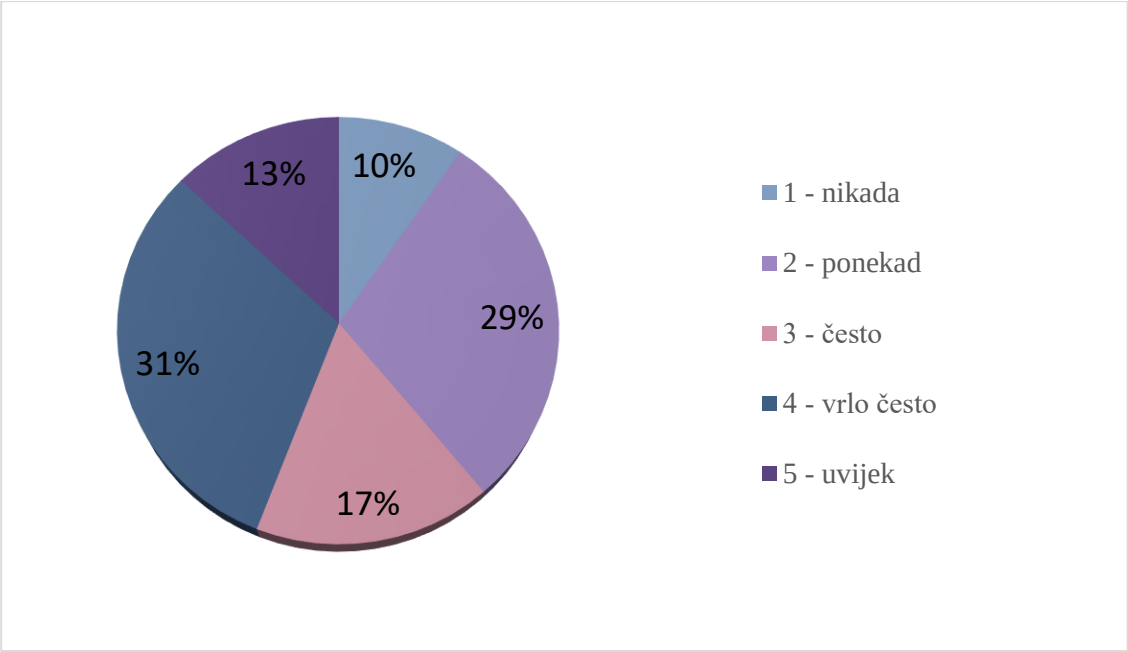
Kao što je prikazano u tablici 4, svaki od ispitivanih čokolada na deklaraciji ima navod koji upućuje na moguće tragove kikirikija ili drugih orašastih plodova, međutim ne postoji univerzalan navod te se na deklaracijama pojavljuju različite verzije.

Ji i suradnici (2011) su proveli istraživanje u kojem su metodom brze detekcije kikirikija (Ara h 1) analizirali uzorke hrane u Kini. Rezultati su pokazali da 2 od 9 analiziranih uzoraka čokolada sadrže tragove kikirikija, a niti jedna čokolada nije sadržavala navod na deklaraciji o mogućoj prisutnosti tragova kikirikija. Naime, u Kini ne postoji regulativa koja definira postavljanje upozorenja o mogućoj prisutnosti tragova alergena na proizvod unatoč činjenici da je Kina jedan od većih izvoznika.

Valja napomenuti kako se kikiriki ne ubraja u orašaste plodove već leguminoze, te se prema Pravilniku o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane (Pravilnik, 2011) nalazi u zasebnoj skupini alergena (Kikiriki i proizvodi od kikirikija). Uzimajući u obzir tu činjenicu, navod o mogućoj prisutnosti ostalih orašastih plodova ne uključuje i kikiriki, stoga se postavlja pitanje koliko su subjekti u poslovanju hranom upućeni u tu činjenicu jer koriste navode koji potrošača mogu navesti na pogrešan zaključak.

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

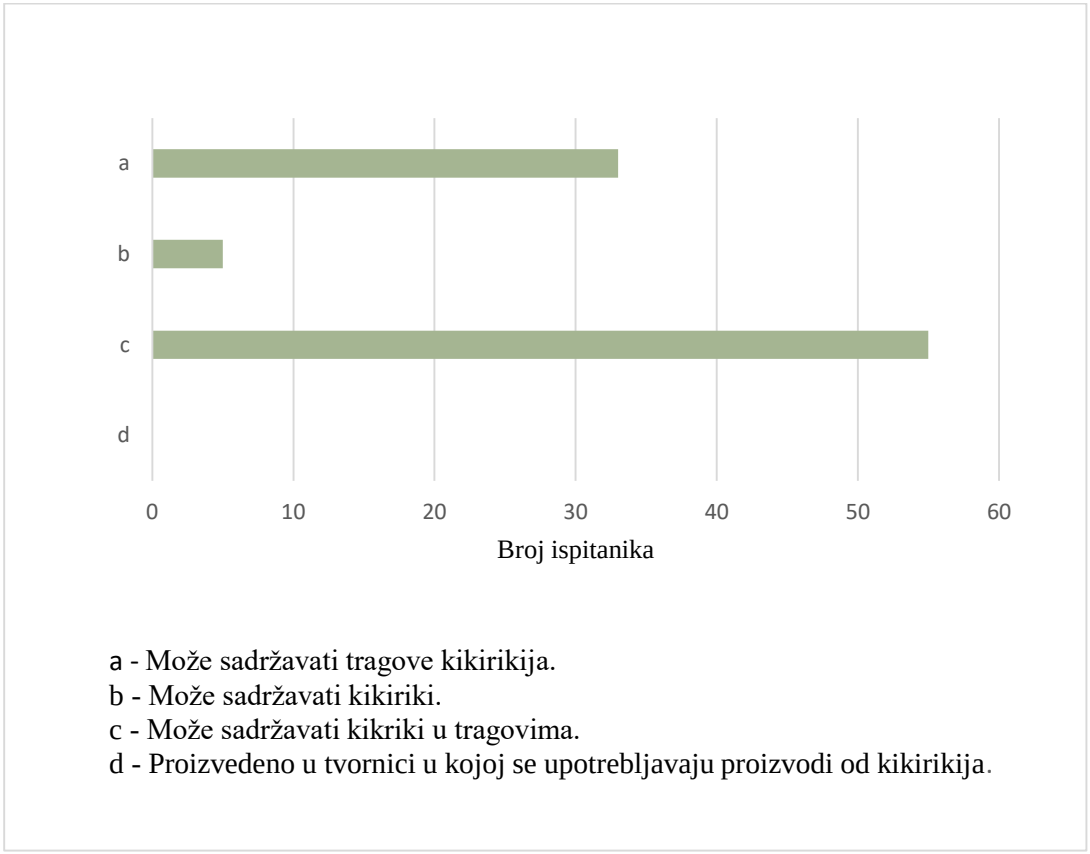
Tijekom ovog istraživanja ispitani su stavovi potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Ispitivanje je provedeno putem posebno osmišljenog upitnika (Prilog 1) čiji je cilj bio prikupiti stavove te dobiti uvid o percepciji potrošača o navodima koje proizvođači stavljaju na deklaracije navedenih proizvoda. Anketirana su 93 ispitanika. Svi odgovori upitnika prikazani su grafički na slikama 9-13.



Slika 10. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=93) na pitanje „Koliko često čitate deklaraciju na proizvodima kao što su čokolade i krem proizvodi?“

Iz rezultata prikazanih na slici 10 vidljivo je da se relativno mali postotak ispitanika izjasnio kako nikad (10 %), odnosno uvijek (13 %) čitaju deklaracije na proizvodima kao što su čokolada i krem proizvodi. Većina ispitanika izjasnila se kako vrlo često (31 %) čita deklaracije na proizvodima poput čokolada i krem proizvoda. Dobiveni rezultati pokazatelj su sve većeg broja potrošača koji čitaju deklaracije na proizvodima poput čokolada i krem proizvoda što se jednim dijelom može pripisati i porastu broja ljudi koji pate od neke nutritivne alergije ili intolerancije (na laktozu ili gluten), kao i trendu pravilne prehrane. Promatrajući dobivene rezultate obzirom na spol, zanimljivo je da se oko 39 % ispitanika muškoga spola izjasnilo kako nikada ne čita deklaracije na proizvodima poput čokolada i krem proizvoda, dok je u slučaju ispitanika ženskog spola takvih samo 10 %. Prema istraživanju Hrvatske agencije za hranu, raste postotak građana koji izražavaju zabrinutost oko sigurnosti hrane. Naime 2010. godine taj postotak iznosio je 19 %, a 2011. godine 35 %. Ispitanike najviše brine kvaliteta i svježina hrane te ostaci pesticida u hrani. Kada je riječ o bolestima kojih se pribojavaju samo 3% je navelo alergije kao asocijaciju na bolest izazvanu hranom. Prema rizicima koji se tiču konzumacije hrane, ispitanike najviše brinu novi virusi (poput ptičje gripe) dok je alergijska reakcija na sedmom mjestu, iza nanočestica, kravljeg ludila, sastojaka ambalaže, dijabetesa i srčanih oboljenja. Zanimljivo je da su ispitanici izabrali većinom obitelj i prijatelje kao izvore povjerenja kada je riječ o sigurnosti hrane, a tek na drugom mjestu su liječnici i zdravstveni radnici. Od svih institucija koje se bave

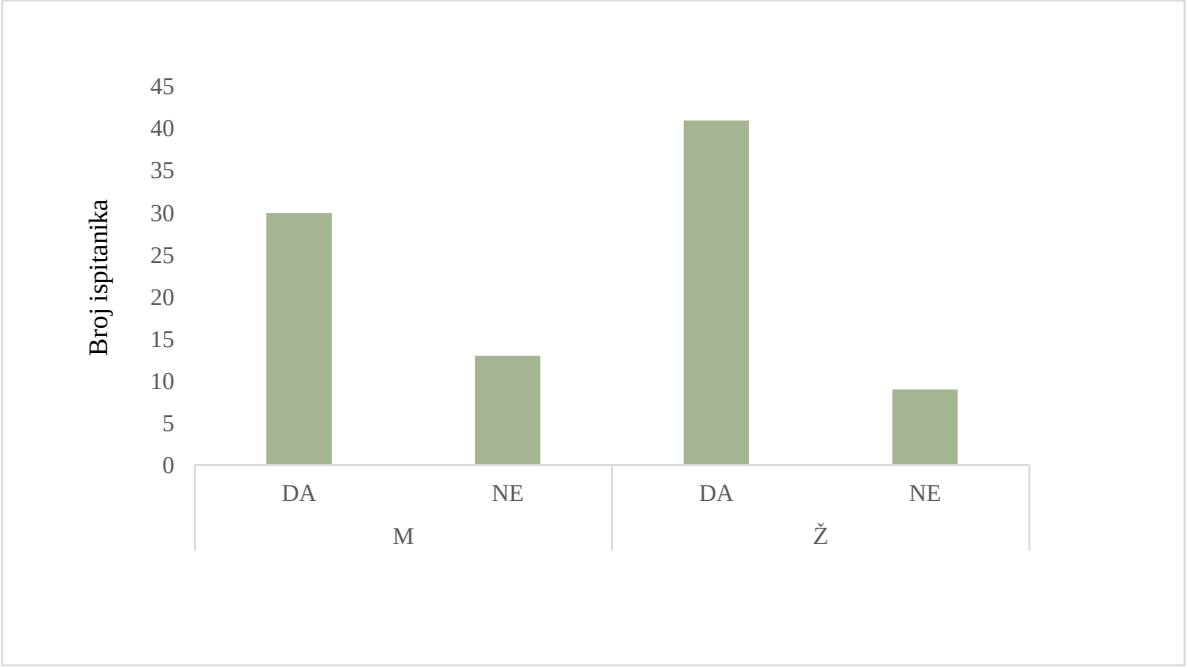
sigurnošću hrane, najveće povjerenje ispitanika ima Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA- engl. *European Food Safety Authority*), a na drugom mjestu je Hrvatska agencija za hranu (HAH, 2016). Ranilović i Colić Barić (2013) su proveli istraživanje o čitanju nutritivnih deklaracija na području Republike Hrvatske, odnosno motivima koji bi osobe koje ne čitaju nutritivne deklaracije motiviralo da to počnu činiti. Prema istraživanju glavni razlozi osoba koje ne čitaju nutritivne deklaracije su: manjak interesa (češće spominjali muškarci, mladi i pušači), izostanak odgovornosti u vezi s nabavkom hrane (češće spominjali ispitanici stariji od 55 godina) i manjak vremena. Čak 43% ispitanika koji ne čitaju nutritivne deklaracije ne zna što bi ih motiviralo da počnu čitati deklaracije. Iz dobivenih rezultata zaključili su da je potrebno uvođenje nutricionističko-edukativnih programa za potrošače.



Slika 11. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=93) na pitanje „Zaokružite izraz koji vam je najpoznatiji sa deklaracija proizvoda kao što su čokolada i krem proizvodi.“

Rezultati prikazani na slici 11 vidljivo ističu kako je potrošačima (njih 59 %) najpoznatiji navod „Može sadržavati kikiriki u tragovima“, a drugi navod s kojim se često susreću je „Može sadržavati tragove kikirikija“. Zanimljivo je kako se niti jedan od ispitanika nije opredijelio za navod „Proizvedeno u tvornici u kojoj se upotrebljavaju proizvodi od kikirikija“. Prema Pravilniku o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane (Pravilnik,

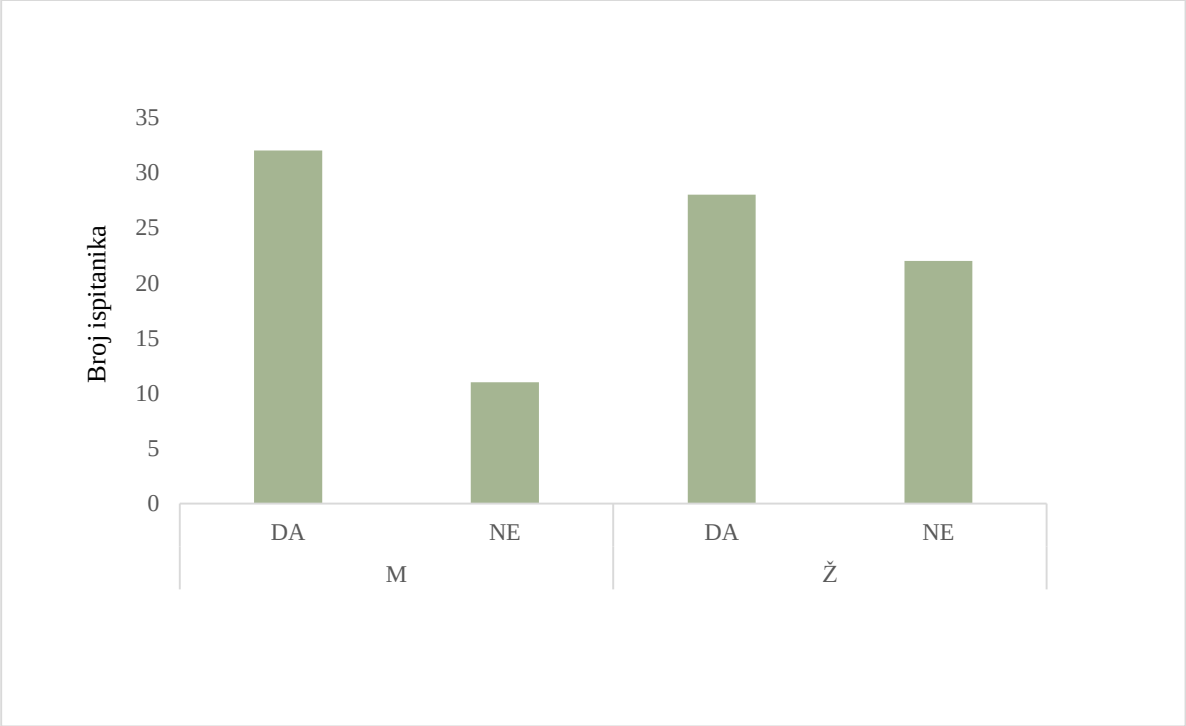
2011) ne postoje definirani izrazi koji se u ovom slučaju stavljaju na deklaraciju proizvoda, stoga se događa da subjekti u poslovanju s hranom stavljaju različite verzije navoda koje, kao što se vidi iz provedenog upitnika, nisu u potpunosti jasne potrošačima. Česta je praksa subjekata u poslovanju s hranom da stavljaju upozorenja o mogućoj prisutnosti alergena kako bi se ogradili od mogućih tužbi potrošača čime dovode potrošača u zabludu, te pokazuju nemogućnost kontrole tehnoloških procesa i lošu proizvođačku praksu. Jedno istraživanje je pokazalo da korištenje navoda poput „Može sadržavati alergen“ više odbija osobe s nutritivnim alergijama od konzumiranja takvog proizvoda u usporedbi s navodom poput „Proizvedeno u tvornici u kojoj se upotrebljavaju proizvodi od kikirikija“ (Hefle i sur., 2007).



Slika 12. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=93), obzirom na spol na pitanje „Ukoliko je na deklaraciji proizvoda kao što su čokolade i krem proizvodi navedeno „Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova“, smatrate li da to uključuje i kikiriki?“

Rezultati na slici 12 prikazuju kakav je stav potrošača o navodu na deklaraciji „Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova“. Naime, kod ispitanika oba spola vidljivo je koliki broj ispitanih smatra kako se kikiriki ubraja u orašaste plodove. Zanimljiva je situacija da deklaracije dvaju uzoraka čokolada, analiziranih tijekom ovog istraživanja, sadrže navod „Može sadržavati tragove ostalih orašastih polodova“, pri čemu u jednom nije detektirana prisutnost kikirikija, dok je u drugom određena koncentracija od 0,35 $mgkg^{-1}$ kikirikija. Ako uzmemo u obzir percepciju većine potrošača koji smatraju da se kikiriki ubraja u orašaste plodove, a ne u leguminoze, tada je jasno koliko ovakvi navodi dovode potrošača u zabludu te

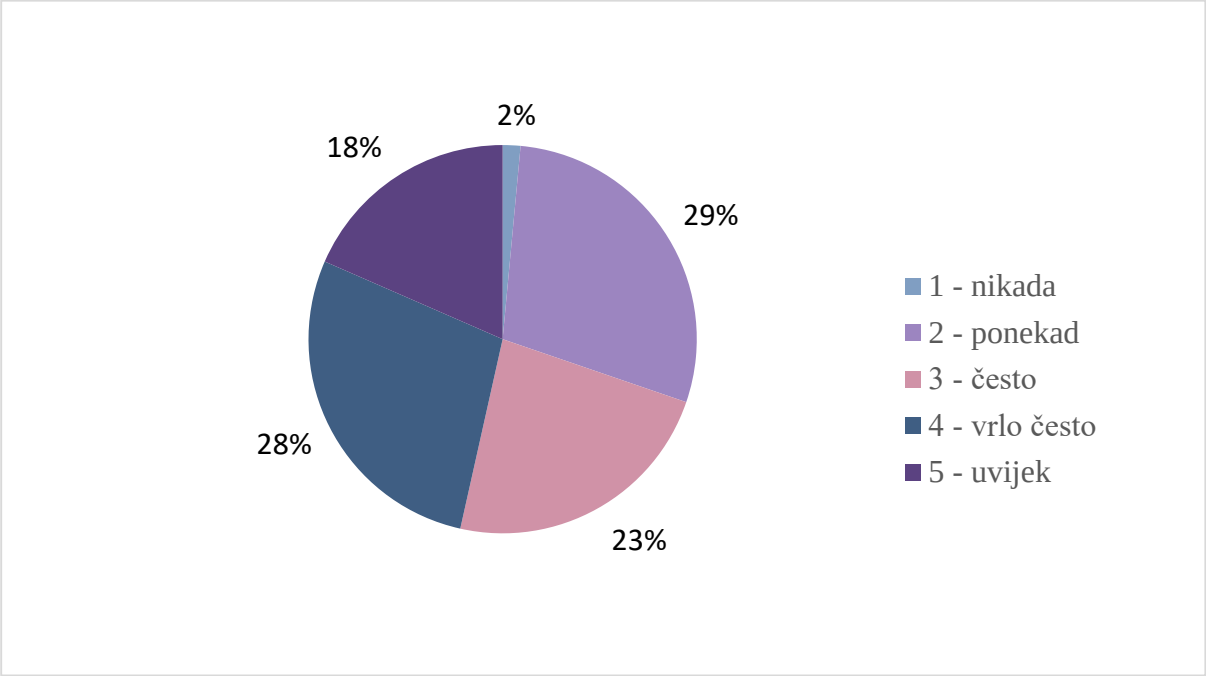
ne daju realnu informaciju o proizvodu. Neke zemlje provode edukaciju djece s nutritivnim alergijama kako bi prepoznala sirovi alergen po izgledu te naučila u kojim namirnicama se ti alergeni nalaze kao sastojci. Obzirom na rezultate upitnika provedenog tijekom ovog istraživanja, vidljivo je da postoji problem s navodima, te uopće kategorijama alergena u koje potrošači nisu upućeni. Definiranjem izraza i navoda te edukacijom potrošača moguće je prevenirati ozbiljnije alergijske reakcije do kojih dolazi zbog nerazumijevanja sadržaja deklaracije.



Slika 13. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=93), obzirom na spol, na pitanje „Ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što su čokolade i krem proizvodi nema navoda o mogućoj prisutnosti tragova kikirikija, smatrate li da taj proizvod ne sadrži tragove kikirikija?“

Kao što je prikazano na slici 13, većina ispitanika (65 %) smatra da ako na proizvodu nema upozorenja o mogućoj prisutnosti kikirikija to znači da taj proizvod ne sadrži tragove kikirikija, odnosno imaju potpuno povjerenje prema proizvođačima. Također vidljiva je razlika u odgovorima obzirom na spol. Naime ispitanice iskazuju nešto manje (56 %) povjerenja, te smatraju da unatoč tome što navoda o mogućoj prisutnosti kikirikija nema, to ne znači da tragovi kikirikija nisu prisutni. Rezultati određivanja udjela kikirikija ELISA testom u uzorcima krem proizvoda provedeni tijekom ovog istraživanja pokazuju kako je u proizvodima bez navoda o mogućoj prisutnosti tragova kikirikija detektirana određena koncentracija potencijalnih alergena kikirikija. Nenavođenje ikakvog navoda dodatno

zbunjuje potrošača koji većinom vjeruju da takvi proizvodi ne sadrže tragove alergena. Zagon i suradnici (2015) su ispitivali prisutnost tragova kikirikija u nekoliko proizvoda, između ostalog i u tri različita krem proizvoda koja nisu sadržavala navod o mogućoj prisutnosti tragova kikirikija, te su ELISA testom u jednom od uzoraka odredili udio kikirikija u koncentraciji od 0,7 $mgkg^{-1}$, dok je koncentracija alergena kikirikija u ostala dva analizirana krem proizvoda bila ispod limita detekcije (Zagon i sur., 2015).



Slika 14. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=93) na pitanje „Navedite koliko često kupujete proizvode kao što su čokolada i krem proizvodi, a koji sadrže navod o mogućoj prisutnosti kikirikija.“

Rezultati prikazani na slici 14 jasno pokazuju kako svega 2 % ispitanika ne kupuje proizvode kao što su čokolada i krem proizvodi, a koji sadrže navod o mogućoj prisutnosti kikirikija. Taj podatak govori da proizvođači ne odbijaju kupce takvim navodima, odnosno da takvi i slični navodi ne utječu uvelike na kupovinu proizvoda kao što su čokolade i krem proizvodi. Prema rezultatima upitnika vidljivo je da navodi o mogućoj prisutnosti kikirikija nemaju negativne konotacije u svijesti potošača. Istraživanja drugih znanstvenika su pokazala kako osobe s nutritivnim alergijama sve više ignoriraju navode o mogućoj prisutnosti alergena (Hefle i sur., 2007) što je posljedica neuređenosti sustava pa predisponirani pojedinci konzumacijom takvih proizvoda preuzimaju rizik po svoje zdravlje koje u nekim slučajevima završi i po život opasnim anafilaktičkim šokom. Naime, alergija na sastojke kikirikija je čest uzrok anafilaktičkog šoka (Yunginger i sur., 1988; Sampson i sur., 1992).

Zakon oko stavljanja navoda o mogućim tragovima alergena (u ovom slučaju kikirikija) je nedefinirana u mnogim zemljama (Hefle, 2006). S druge strane zadnjih nekoliko godina popularno je korištenje različitih navoda od strane subjekata u poslovanju hranom koji stavljaju hranu na tržište, zbog čega raste frustriranost osobe koja je alergična pri svakodnevnom odabiru i kupovini namirnica zbog potencijalnog rizika kojem se izlažu (Bock i sur., 2007). Jedan od efektivnih načina sprečavanja alergijskih reakcija je prevencija pa upravo zbog izbjegavanja dotičnog alergena, osobe koje imaju neku nutritivnu alergiju primorani su detaljno čitati deklaracije na pakiranim proizvodima. Kako bi se razvile metode brze detekcije alergena u hrani ali i metodika odabira uzorka hrane potrebna su dodatna istraživanja (Elegbede i sur., 2015) te njihova implementacija u industriju hrane. Otežavajuća okolnost u detekciji potencijalnih tragova alergena je velika količina uvezene robe, posebno iz zemalja trećeg svijeta, u kojima je, prema RASFF izvješću za 2015. godinu, česta pojava alergena u tragovima (RASFF, 2015). Dakle veliku ulogu imaju sljedivost u prehrambenom lancu, različite organizacije i nadležna tijela odgovorna za provođenje kontrola, kao i politika trgovine u svijetu.

Od svih metoda ELISA metode pokazuju najveći potencijal u detekciji skrivenih alergena u hrani (Besler i sur., 2002). Tijekom ovog istraživanja, ELISA metodom je određena koncentracija kikirikija u proizvodima poput čokolade i krem proizvoda (tablica 1 i 3) te je analiziran dio deklaracija istih proizvoda koji se odnosi na navode o mogućoj prisutnosti tragova alergena (tablica 2 i 4). Osim toga proveden je i upitnik nad 93 ispitanika o stavovima vezano za navode na deklaracijama proizvoda poput čokolada i krem proizvoda. Percepcija potrošača o tome u koju skupinu alergena se ubraja kikiriki često je pogrešna pa mnogi smatraju kako spada u orašaste polodove (slika 12). U proizvodima s navodom i u onima bez navoda, pronađena je određena koncentracija kikirikija. Pregledom zakona i pravilnika utvrđeno je da područje vezano uz označavanje tragova alergena nije definirano u cijelosti (Zakon, 2015) pa subjekti u poslovanju hranom koji su direktno odgovorni za proizvode koje stavljaju na tržište, prema preferencama stavljaju različite navode, odnosno ne stavljaju navode uopće. Također provedeni upitnik pokazuje da izrazi i navodi koje subjekt u poslovanju hranom stavlja na deklaracije djeluje zbunjujuće potrošačima, te da postoji nerazumijevanje i krivo razumijevanje dotičnih navoda (slika 12). O kompleksnosti problema govori i činjenica da se s tim problemom susreće veliki broj zemalja (Kina, SAD) koje nemaju u potpunosti definiranu zakonsku regulativu vezano uz navođenje informacija o tragovima alergena (Hefle i sur., 2007; Chang i sur., 2013).

Zaključci mnogih istraživanja o potrošačima (Ranilović i Colić Barić, 2013, Hefle i sur., 2007) su potreba edukacije potrošača kako bi se smanjilo nerazumijevanje ili krivo razumijevanje navoda na deklaracijama prehrambenih proizvoda. Zbog zaštite potrošača i veće sigurnosti hrane potrebno je razviti sustav brze detekcije tragova alergena u industriji te voditi računa o navedenoj problematici kroz zakonsku regulativu i edukaciju potrošača.

5. ZAKLJUČCI

Obzirom na prikazane rezultate i provedenu raspravu, može se zaključiti sljedeće:

1. Za detekciju potencijalnih alergena kikirikija korištena je imunoenzimska ELISA metoda. U analiziranim uzorcima krem proizvoda detektirani su potencijalni alergeni kikirikija, a udio određen ELISA metodom kretao se u rasponu od 0,27 ± 0,010 do 3,90 ± 0,020 $mgkg^{-1}$.
2. Između analiziranih uzoraka čokolade s lješnjakom, u samo jednom uzorku nisu detektirani potencijalni alergeni kikirikija. Raspon udjela potencijalnih alergena kikirikija određenih ELISA metodom u ostalim analiziranim uzorcima čokolade s lješnjakom iznosio je od 0,27 ± 0,010 do 4,05 ± 0,030 $mgkg^{-1}$.
3. Uzorak "Krem proizvod 8" te uzorci "Čokolada 2", "Čokolada 4", "Čokolada 5" i "Čokolada 6" ujedno sadrže i navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena kikirikija.
4. Najpoznatiji navod sa deklaracija proizvoda kao što su čokolade i krem proizvodi bio je navod: "Može sadržavati kikiriki u tragovima" kojeg je odabralo 59% ispitanika. Navedeni navod pojavljuje se na deklaracijama analiziranih uzoraka čokolade s lješnjakom, odnosno na uzorcima "Čokolada 4" i "Čokolada 6", dok analizirani uzorci krem proizvoda ne sadrže navedeni navod.
5. 74 % ispitanika muškog spola i 56 % ispitanica smatra da ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što su čokolada i krem proizvodi nema navoda o mogućoj prisutnosti kikirikija, taj proizvod ne sadrži tragove kikirikija. Tijekom ovog istraživanja, u sedam analiziranih uzoraka krem proizvoda te dva uzorka čokolada s lješnjakom bez navoda, ELISA metodom detektirani su potencijalni tragovi kikirikija.

6. LITERATURA

Allen, J.C., Smith, C.J. (1987) Enzyme-linked immunoassay kits for routine food analysis. *Trends Biotechnol.* **5**, 193–199.

Anonymous 1 (2016) "sendvič" ELISA test <http://www.agrif.bg.ac.rs>. Pristupljeno 29.kolovoza 2016.

Anonymous 2 (2016) konkurentni ELISA test <http://www.agrif.bg.ac.rs>. Pristupljeno 29.kolovoza 2016.

Astwood, J.D., Leach, J.N., Fuchs, R.L. (1996) Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1269-1273.

Ayob, M.K., Smith, C.J. (1990) Immunoassay techniques for food analysis. *Sains Malays.* **19**, 1–28.

Bannon, G.A., Besler, M. Heflé, S.L., Hourihane, J. O'B., Sicherer, S.H. (2000) Allergen data collection: peanut (*Arachis hypogea*). *Internet Symposium on Food Allergens*, **2**, 87–122.

Barnett, D., Howden, M.E.H. (1984) A rocket immunoelectrophoretic method for the detection of heat-treated peanut protein. *Food Technol. Aust.* **36**, 510– 511.

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. (2001) Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 1077–1081.

Bock, S.A., Munoz-Furlong, A., Sampson, H.A. (2007) Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1016-1018.

Bonwick, G.A., Yasin, M., Hancock, P. (1996) Synthetic pyrethroids in fish: Analysis by gas chromatography- mass spectrometry operated in the negative ion chemical ionisation mode and ELISA. *Food Agric. Immunol*. **8**, 185–194.

Burks, A.W., Sampson, H.A., Bannon, G.A. (1998) Peanut allergens. *Allergy* **53**, 725– 730.

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

Bush, R.K., Taylor, S.L. (2003) Histamine. U: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 2.izd., (Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P., ured.), Elsevier Science, Oxford, str. 3108–3111.

Chang, A.S., Sreedharan, A., Schneider, K.R. (2013) Peanut and peanut product: A food safety perspective. *Food Control*, **32**, 296-303.

Chu, P.W.S., Chan, K.M., Cheung, S.T.C., Wong, Y.C. (2010) Review of analytical techniques used in proficiency-testing programs for melamine in animal feed and milk. *Trends Anal. Chem.* **29**, 1014-1026.

Chung, S.Y., Kato, Y., Champagne, E.T. (2005) Polyphenol oxidase/caffeic acid may reduce the allergenic properties of peanut allergens. *J. Sci. Food Agr.* **85**, 2631-2637.

Chung, S.Y., Yang, W., Krishnamurthy, K. (2008) Effects of pulsed UV-light on peanut allergens in extracts and liquid peanut butter. *J. Food Sci.* **73**, 400-404.

Church, M.K., Shute, J.K., Sampson, A.P. (2003) Mast cell-derived mediators. U: Middleton's Allergy Principles and Practice, 6. izd., (Adkinson, N.F., Yunginger J.W., Busse, W.W., Bochner, B.S., Holgate, S.T., Simons, F.E.R, ured.), Mosby, St Louis, str. 189–212.

Clarke, M.C.A, Kilburn, S.A., Hourihane, J.O'B., Dean, K.R., Warner, J.O. Dean, T.P. (1998) Serological characteristics of peanut allergy. *Clin. Exp. Allergy* **28**, 1251– 1257.

de Boer, E., Beumer, R.R. (1999) Methodology for detection and typing of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.*, **50**, 119–130.

Dodo, H.W., Konan, K.N., Chen, F.C., Egnin, M., Viquez, O.M. (2008) Alleviating peanut allergy using genetic engineering: the silencing of the immunodominant allergen Ara h 2 leads to its significant reduction and a decrease in peanut allergenicity. *Plant Biotechnol.* **6**, 135-145.

Elegbede, C.F., Papadopoulos, A., Gauvreau, J., Crépet, A. (2015) A Bayesian network to optimise sample size for food allergen monitoring. *Food Control* **47,** 212-220.

EU (2016) Europska unija <http://eur-lex.europa.eu>. Pristupljeno 1.rujna 2016

FDA (2016) Food and Drug Administration <http://www.fda.gov>. Pristupljeno 1.rujna 2016.

Freeman, A.K., Morris, N.J., Willich, R.K. (1954) Peanut butter. *U.S. Dep. Agric.* AIC–370.

Gern, J.E., Yang, E., Evrard, H.M., Sampson, H.A. (1991) Allergic reactions to milk-contaminated 'non-dairy' products. *N. Engl. J. Med.* **324**, 976–979.

Hansen, T.K., Bindslev-Jensen, C. (1992) Codfish allergy in adults. Identification and diagnosis. *Allergy* **47**, 610-617.

Hefle, S. (2006) Methods for detecting peanuts in food. U: Detecting allergens in food (Koppelman S.J., Hefle, S.L., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 185-200.

Hefle, S.L., Chu, F.S., Yunginger, J.W., Bush, R.K. (1994) A sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitation of selected peanut proteins in foods. *J. Food Prot.* **57**, 419–423.

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. Immunol.* **120**, 171-176.

Hennion, M.C., Barcelo, D. (1998) Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. *Analytica Chimica Acta* **362**, 3-34.

Holzhauser, T., Dehne, L.I., Hoffmann, A., Haustein, D., Vieths, S. (1998) Rocket immunoelectrophoresis (RIE) for determination of potentially allergenic peanut proteins in processed foods as a simple means for quality assurance and food safety. *Z. Lebens. Unters. Forsch. A.* **206**, 1–8.

Hourihane, J.O'B., 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. Immunol.* **100**, 596-600.

Hugget, A.C., Hischenhuber, C. (1998) Food manufacturing initiatives to protect the allergic consumer. *Allergy* **53**, 89-92.

Immer, U., Reck, B., Lindeke, S., Koppelman, S. (2004) Ridascreen fast peanut, a rapid and safe tool to determine peanut contamination in food. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **39**, 869– 871.

Indyk, H.E., Evans, E.A., Bostrom Casalunghe, M.C. (2000) Determination of biotin and folate in infant formula and milk by optical biosensor-based assay. *J. AOAC Int.* **83**, 1141–1148.

Johansson, M.A., Hellenas, K.E. (2004). Immunobiosensor determination of b-agonists in urine using integrated immunofiltration cleanup., *Int. J. Food Sci. Tech.* **39**, 891–898.

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. Immunol.* **108**, 133-140.

Keck-Gassenmeier, B., Benet, S., Rosa, C., Hischenhuber, C. (1999) Determination of peanut traces in food by a commercially-available ELISA test. *Food Agric. Immunol.* **11,** 243-250.

Koppelman, S.J., Bleeker-Marcelis, H., van Duijn, G., Hessing, M. (1996) Detecting peanut allergens: the development of an immunochemical assay for peanut proteins. *The World of Ingredients* **7195**, 35–38.

Koppelman, S.J., Knol, E.F., Vlooswijk, R.A.A., Wensing, M., Knulst, A.C., Hefle, S., Gruppen, H., Piersma, S. (2003) Peanut allergen Ara h 3:isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy* **58**, 1144–1151.

Koppelman, S.J, Vlooswijk, R.A.A., Knippels, L.M.J., Hessing, M., Knol, E.F., van Reijsen, F.C., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M. (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., Wensing, M., Ertmann, M., Knulst, A.C., Knol, E.F. (2004) Relevance of Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h 2 is the most important peanut allergen. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 583–590.

Kukić, S., Markić, B. (2011) Metode, tehnike, postupci i instrumenti znanstvenoistraživačkog rada. *Informatologia* **44**, 159-160.

Lee, S., Oh, S., Jang, D., Lee, J., Byun, M. (2008) Evaluation of reduced allergenicity of peanut extract by gamma irradiation in murine model of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 184.

Mahan, L.K., Escott-Stump, S. (2008) Krause's Food¸& Nutrition Therapy (12. izd.), Saunders Elsevier, St.Louis, Missouri, str.743.

Maleki, S.J., Chung, S.Y., Champagne, E.T., Raufman, J.P. (2000) The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, 763–768.

Mittag, D., Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B.K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W.M., Koppelman, S., Helbling, A., Hefle, S.L., van Ree, R., Vieths, S. (2004) Ara h 8; a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol*. **114**, 1410–1417.

Myrtazina, M.R., Eremin, S.E., Mozoleva, O.V., Everest, S.J., Brown, A.J., Jackman, R. (2004) Fluorescent polarization immunoassay for sulphadiazine using high specificity antibody. *Int. J. Food Sci. Tech.* **39**, 1-8.

Norgaard, A., Bindslev-Jensen, C. (1992) Egg and milk allergy in adults. Diagnosis and characterization. *Allergy* **47**,503-509.

Nwaru, B.I., Hickstein, L., Panesar, S.S., Roberts, G., Muraro, A. i Sheikh, A. (2014) EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. Prevalence of common FA in Europe: a systematic review and metaanalysis. *Allergy* **69**, 992–1007.

Peng, J., Song, S., Xu, L., Ma, W., Liu, L., Kuang, H., Xu, C. (2013) Development of a Monoclonal Antibody-Based Sandwich ELISA for Peanut Allergen Ara h 1 in Food. *Int. J. Environ. Res.* **10**, 2897–2905.

Pomes, 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. Immunol.* **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.

Pravilnik o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane (2011) *Narodne novine* **79**, Zagreb.

Ranilović, J., Colić Barić, I. (2013) Perceived barriers and motives to reading nutrition label among label 'non-users' in Croatia. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, **8**, 52-58.

RASFF (2016) Rapid Alert System for Food an Feed <http://ec.europa.eu/food/safety/docs/rasff_annual_report_2015.pdf>. Pristupljeno 1.rujna 2016.

Reese, G., Lehrer, S.B. (1999) Food allergens. U: Food hypersensitivity and adverse reactions: a practical guide for diagnosis and management, (Frieri, M., Kettelhut, B., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 69-97.

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. (2004) Update on food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol*. **113**, 805-819.

Schappi, G.F., Konrad, V., Imhof, D., Etter, R., Wuthrich, B. (2001) Hidden peanut allergens detected in various foods: findings and legal measures. *Allergy* **56**, 1216– 1220.

Scurlock, A.M., Burks, A.W. (2004) Peanut allergenicity *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **93**, 12–18.

Smith, C.J., Williams, P.A., Jones, M., Phillips, G.O. (1990) Procedure for the detection of aflatoxins in gum Arabic samples. *Food Hydrocolloid.* **4**, 221–225.

Taylor, S.L. (1990) Food allergies and related adverse reactions to foods: a food science perspective. U: Food Allergies and Adverse Reactions (Perkin, J.E., ured.), Aspen Publishers, Rockville, str. 189–206.

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

Wang, S., Xu, B., Zhang, Y., He, J.X. (2009) Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney. *Meat Sci.* **82**, 53-58.

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. Immunol.* **110**, 915-920.

Yunginger, J.W., Gauerke, M.B., Jones, R.T., Dahlberg, M.E., Ackerman, S.J. (1983) Use of radioimmunoassay to determine the nature, quantity and source of allergenic contamination of sunflower butter. *J. Food Prot.* **46**, 625–628.

Yunginger, J.W., Sweeney, K.G., Sturner, W.Q., Giannandrea, L.A., Teigland, J.D., Bray, M., Benson, P.A., York, J.A., Biedrzycki, L., Squillaceet, D.L., Helm, R.M., (1988) Fatal food-induced anaphylaxis. *J. Am. Med. Assoc*. 260, 1450–1452.

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.

Zhang, H., Wang, S. (2009) Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. *J. Immunol. Methods*, **350**, 1-13.

7. PRILOZI

Prilog 1. UPITNIK O KIKIRIKIJU I PROIZVODIMA OD KIKIRIKIJA KAO TVARIMA ILI PROIZVODIMA KOJI UZROKUJU ALERGIJE

1. Spol: M Ž
2. Dob:
3. Obrazovanje:
   - osnovna škola
   - srednja škola
   - sveučilišna razina (fakultet)

4. Jeste li alergični na orašaste plodove? DA NE
5. Jeste li alergični na kikiriki? DA NE
6. Koliko često čitate deklaraciju na proizvodima kao što su čokolade i krem proizvodi?

   1 2 3 4 5

   (1-nikada, 2-ponekad, 3-često, 4-vrlo često, 5-uvijek)

7. Zaokružite (jedan) izraz koji vam je najpoznatiji sa deklaracija proizvoda kao što su čokolade i krem proizvodi.
   - Može sadržavati tragove kikirikija
   - Može sadržavati kikiriki
   - Može sadržavati kikiriki u tragovima
   - Proizvedeno u tvornici u kojoj se upotrebljavaju proizvodi od kikirikija

8. Ukoliko je na deklaraciji proizvoda kao što su čokolade i krem proizvodi navedeno „Može sadržavati tragove ostalih orašastih plodova“, smatrate li da to uključuje i kikiriki?

   DA NE

9. Ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što su čokolade i krem proizvodi nema navoda o mogućoj prisutnosti tragova kikirikija, smatrate li da taj proizvod ne sadrži tragove kikirikija?

   DA NE

10. Navedite koliko često kupujete proizvode kao što su čokolada i krem proizvodi, a koji sadrže navod o mogućoj prisutnosti kikirikija?

    1 2 3 4 5

    (1-nikada, 2-ponekad, 3-često, 4-vrlo često, 5-uvijek)