

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Josip Petrić

6831/PT

IMUNOENZIMSKE (ELISA) METODE U ANALITICI
PREHRAMBENIH PROIZVODA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Analitika prehrambenih proizvoda

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

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

IMUNOENZIMSKE (ELISA) METODE U ANALITICI PREHRAMBENIH PROIZVODA

Josip Petrić 6831/PT

Sažetak: Imunološke metode razvijene su u svrhu određivanja složenih bioloških molekula, a obuhvaćaju široku paletu metoda koje se koriste u razne svrhe pa tako pronalaze i primjenu u prehrambenoj industriji. Često korištenu imunološku metodu predstavlja imunoenzimska ELISA metoda (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA). Cilj ovog rada je, pregledom znanstvene literature, istaknuti pojedine primjere primjene ELISA metoda u analitici prehrambenih proizvoda. ELISA testovi obuhvaćaju široku primjenu koja uključuje, između ostalog, određivanje različitih kontaminanata i rezidua u prehrambenim proizvodima, procjenu autentičnosti hrane, određivanje potencijalnih alergena hrane te detekciju genetski modificiranih organizama.

Ključne riječi: ELISA, antigen, antitijelo, imunoenzimska reakcija

Rad sadrži: 23 stranice, 5 slika, 1 tablicu, 29 literaturnih navoda

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

Rad predan: srpnja 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

IMMUNOENZYMATIC (ELISA) METHODS IN ANALYSIS OF FOOD PRODUCTS

Josip Petrić 6831/PT

Abstract: Immunological methods have been developed for the determination of complex biological molecules, and a wide variety of methods are used for various purposes and thus find application in the food industry. The commonly used immunoenzymatic assay is ELISA method (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA). The goal of this work is through scientific literature, highlight examples of the application of ELISA methods in analysis of food products. ELISA assays include broad applications, that includes, among other things, the determination of various contaminants and residues in food products, food authenticity assessment, determination of potential food allergens and detection of genetically modified organisms.

Keywords: ELISA, antigen, antibody, immunoenzyme reaction

Thesis contains: 23 pages, 5 figures, 1 table, 29 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kaciceva 23, Zagreb

Mentor: PhD. Ksenija Marković, Associate Professor

Thesis delivered: July 2016.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PRINCIPI IMUNOLOŠKIH ODREĐIVANJA	2
2.1.1. ELISA test	3
2.1.1.1. "Sendvič" ELISA.....	4
2.1.1.2. Konkurentna ELISA.....	5
2.2. PRIMJERI PRIMJENE ELISA METODA U ODREĐIVANJU KONTAMINANATA I REZIDUA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA	6
2.2.1. Određivanje akrilamida	6
2.2.2. Određivanje atrazina.....	7
2.2.3. Određivanje antibiotika	8
2.2.4. Određivanje mikotoksina.....	10
2.2.5. Određivanje karbonil proteina.....	12
2.3. PRIMJENA ELISA METODA U PROCJENI AUTENTIČNOSTI PREHRAMBENIH PROIZVODA	13
2.3.1. Meso i mesni proizvodi	13
2.3.2. Riba i riblji proizvodi	14
2.3.3. Mlijeko i mliječni proizvodi	15
2.3.4. Voćni sok.....	16
2.4. PRIMJENA ELISA METODA U ODREĐIVANJU ALERGENA HRANE	16
2.5. PRIMJENA ELISA METODA U DETEKCIJI GMO-a.....	18
3. ZAKLJUČAK	20
4. LITERATURA	21

1. UVOD

Imunološke metode obuhvaćaju široku paletu metoda koje se koriste u razne svrhe pa tako i u prehrambenoj industriji, točnije analitici prehrambenih proizvoda. Temelje se na specifičnosti vezanja antigena i antitijela te upravo zbog svoje specifičnosti nalaze primjenu u ovom području.

Često korištenu imunološku metodu predstavlja imunoenzimska ELISA metoda (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA). ELISA se u području prehrambene industrije najviše koristi u određivanju kontaminanata, procjeni autentičnosti hrane, a u današnje vrijeme i određivanju alergena u hrani te također za detekciju genetski modificiranih organizama, a predstavlja selektivnu, brzu i osjetljivu metodu.

Cilj ovog rada biti će, pregledom znanstvene literature, istaknuti pojedine primjere primjene ELISA metoda u analitici prehrambenih proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PRINCIPI IMUNOLOŠKIH ODREĐIVANJA

Imunološki testovi se temelje na specifičnosti vezanja antigena i antitijela. Izuzetna specifičnost antitijela za antigene čini antitijela važnim reagensima za detekciju i pročišćavanje antigena. Obrnuto, kao reagens za identifikaciju i kvantifikaciju specifičnih antitijela koriste se antigeni.

Antigeni su tvari koje su sposobne, pod odgovarajućim uvjetima, izazvati produkciju specifičnih antitijela. Postoje razlike između antigena i antigenskog materijala. Antigen je molekula koja ima sposobnost da potakne stvaranje antitijela te sposobnost specifičnog reagiranja sa antitijelima.

Prvi je korak u razvoju metoda priprava prikladnog antitijela. Nakon imunizacije životinja antigenom te uzimanja uzoraka, serum takovih životinja sadrži poliklonska antitijela. Stanice slezene dobivene od imuniziranih životinja se koriste pak za proizvodnju hibrida stanica koje izlučuju monoklonska antitijela (Graham i sur., 2004).

Razvitak tehnike proizvodnje monoklonskih antitijela uvjetovao je mogućnost dobivanja antitijela za gotovo svaki tip makromolekula, čime su tehnike bazirane na reakciji antigen-antitijelo dobile široku primjenu u istraživačkom radu i kliničkim ispitivanjima. Detekcija antigena ili antitijela je moguća ukoliko reakcija antigen-antitijelo može biti vidljiva ili izmjerena. Selekcija metode ovisi o svojstvima antigena (veličina, broj i struktura antigena), svojstvima odgovarajućih antitijela (specifičnost, afinitet) i koncentraciji antigena koji se određuje. Kritični faktor je odnos koncentracija antigena i antitijela.

Tehnike koje se baziraju na reakciji antigen-antitijelo mogu se podijeliti u dvije kategorije: neizravne i izravne, odnosno indirektne i direktne. Indirektnim metodama koje omogućuju izravnu vizualizaciju svojstvena je relativna neosjetljivost jer je neophodno prisustvo dovoljno reaktanata za formiranje vidljivih precipitata, odnosno agregata imunogenih kompleksa. Direktna mjerenja antigen-antitijelo kompleksa su vrlo osjetljiva obzirom da se koriste uređaji koji izravno mjere reakciju (Kindt i sur., 2006).

Moderne imunološke metode su nastale iz želje da se otkriju i kvantificiraju složene biološke molekule jer kemijske i fizikalne analitičke metode su ili neprikladne ili nisu dostupne. Visoka osjetljivost i visoka specifičnost reakcije antitijelo-antigen su privukli pozornost znanstvenika koji žele iskoristiti ta svojstva u potrazi za poboljšanim analitičkim tehnikama. Dapače, sve se više žele razviti novi osjetljivi testovi i testovi koji omogućuju detekciju širokog spektra sastojaka. Pokretačka snaga za ove metode se s vremenom promijenila. Izvorno, imunološke metode su se razvile kako bi se olakšalo proučavanje imunologije, posebno u antigen-antitijelo interakcijama. Ova istraživanja usko su povezana s kliničkim istraživanjima te se koriste u medicinske svrhe. Imunoenzimska ELISA metoda (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) predstavlja jedan od osnovnih testova u okviru imunoloških testova (Bonwick i Smith, 2004).

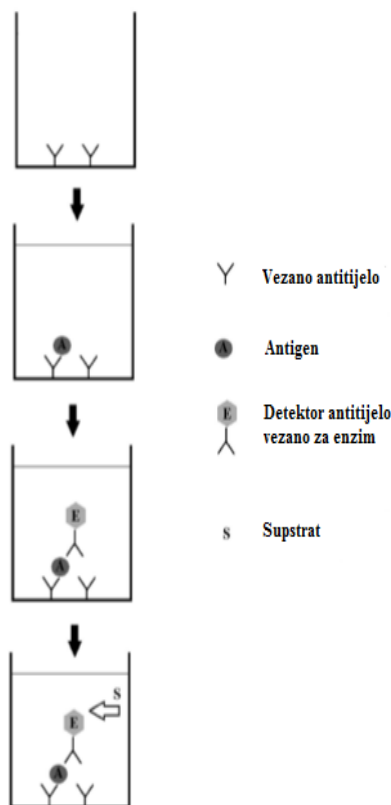
2.1.1. ELISA test

Imunoenzimskim ELISA testom (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) se određuje prisutnost i količina antigena. Reakcija ELISA se temelji na vezanju antitijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje (Slika 1). Ovom visoko osjetljivom i selektivnom metodom moguće je odrediti vrlo nisku koncentraciju analita od primjerice nekoliko ng po kg ispitivanog uzorka. Postoji više vrsta tehnika imunološkog određivanja pomoću testa ELISA: indirektna, "sendvič", konkurentna i nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča (Butorac i sur., 2013).

Uvođenju ELISA metode u istraživanja prethodilo je otkriće da se topljivi antigen ili protutijela mogu vezati za čvrstu podlogu tako da se ne isperu puferiranom fiziološkom otopinom. U tu se svrhu rabe polistirenske mikrotitracijske plitice četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica (Runje i sur., 2006).

Sama metodologija ELISA tehnika uključuje imobilizaciju jedne ili dvije komponente, tj. antigena ili antitijela na čvrstu podlogu. To uklanja probleme separacije, obzirom da nakon reakcije između vezane i nevezane komponente jedna komponenta ostaje pričvršćena na čvrstu podlogu, a ostatak se jednostavno uklanja pri čemu ostavlja vezani reaktant u obliku u kojem ga je moguće lako izmjeriti. Mjerenje predstavlja drugu veliku prepreku koja je obzirom na metodologiju riješena na način da se jedna komponenta, odnosno detektor

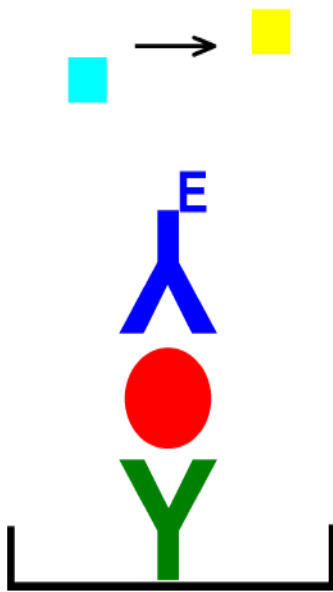
antitijelo, obilježi s enzimom. Obilježena antitijela se tada mogu detektirati. Nakon dodatka supstrata za enzim, reakcija rezultira mjerljivim promjenama intenziteta obojenja. Imunoenzimski testovi dolaze u mnogim oblicima i imaju brojne primjene. Analitičarima su dostupni komercijalni testovi ili pak razvijaju specifične testove za svoje vlastite primjene. Konačni odabir ovisi o opremi u laboratoriju. Imunoenzimske metode pružaju neprocjenjiv alat za prehrambenog stručnjaka koji te metode koristi u kontroli kvalitete i osiguranju sigurnosti prehrambenih proizvoda (Bonwick i Smith, 2004).



Slika 1. Imunoenzimski test ELISA (Butorac i sur., 2013)

2.1.1.1. "Sendvič" ELISA

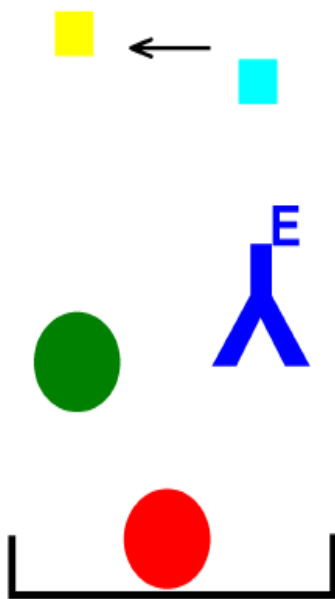
"Sendvič" ELISA mjeri količinu antigena između dvaju slojeva antitijela (hvatanje i detekcija antitijela). Antigen koji se određuje mora sadržavati najmanje dva antigenska mjesta sposobna za vezanje na antitijela, jer najmanje dva antitijela djeluju u "sendviču". Prednost ovih testova je što uzorak ne mora biti čist prije analize i ispitivanja mogu biti jako osjetljiva (Anonymous 1). Izmjerena apsorbancija je direktno proporcionalna koncentraciji analita (Slika 2) (Besler i sur., 2002).



Slika 2. Princip "sendvič" ELISA testa (Besler i sur., 2002)

2.1.1.2. Konkurentna ELISA

Konkurentna ELISA metoda često uključuje imobiliziranje antigena i njihovo vezanje na krutu fazu. Ukoliko uzorak ne sadrži antigen, antitijelo označeno enzimom pokazuje maksimalno vezanje na krutu fazu što rezultira visokim izmjerenim vrijednostima apsorbancije obojenog produkta. Povećanjem udjela antigena u uzorku, dolazi do inhibicije vezanja antitijela označenih enzimima na podlogu te posljedično i nižih izmjerenih vrijednosti apsorbancije (Slika 3) (Besler i sur., 2002).



Slika 3. Princip konkurentnog ELISA testa (Besler i sur., 2002)

2.2. PRIMJERI PRIMJENE ELISA METODA U ODREĐIVANJU KONTAMINANATA I REZIDUA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

ELISA metode se, zbog svoje visoke osjetljivosti i brzine, sve više upotrebljavaju i često koriste pri određivanju tragova kontaminanata i rezidua u prehrambenim proizvodima.

2.2.1. Određivanje akrilamida

Akrilamid je kemijski sastojak koji nastaje u industrijskim procesima kroz kataliziranu hidrolizu akrilonitrila. Korišten je skoro 60 godina u sintezi modificiranih poliakrilamida koji se upotrebljavaju u raznim granama industrije poput proizvodnje plastike, ljepila, kozmetike te cementa za građevinske potrebe. Ti sastojci se također koriste pri obradi otpadnih voda kao koagulans. Poliakrilamid pronalazi veliku ulogu u industriji koja uključuje gel elektroforezu proteina i aminokiselina te imobilizaciju enzima na stacionarne ploče.

Kvantifikacija akrilamida se može provoditi bioanalitičkim metodama. Jedna od njih je ELISA pri kojoj se identifikacija i kvantitativna determinacija bazira na imunološkoj reakciji.

Primjena ELISA metode u kvantifikaciji akrilamida zahtjeva sintezu specifičnih antitijela koja su se ranije teško sintetizirala zbog svoje niske molekulske mase. Općenito, spojevi sa molekulskom masom ispod 1000 Da nisu imunogeni i ne izazivaju sintezu antitijela. Znanstvenici predlažu korištenje poliklonalnih antitijela u tu svrhu. Izolacijom akrilamid vezujućih antitijela, omogućeno je kvantitativno određivanje akrilamida u hrani. Zbog niske molekulske mase i nedostatka jakih epitopnih skupina, akrilamid ne može izazvati sintezu specifičnih antitijela sam, međutim, utvrđeno je da se povezuje (kao hapten) na imunostimulirajuće proteinske nosače koji onda stimuliraju sintezu antitijela.

Jedna od mogućnosti kvantifikacije akrilamida pomoću ELISA metode temelji se na reakciji između Ade-3 MBA-HSA antigena sa specifičnim antitijelom. Detekcija se sastoji od reakcije sa dodanim specifičnim antitijelima označenim peroksidazom iz hrena (HPR). Reakcija koju katalizira ovaj enzim doprinosi obojenju produkta, a apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 450 nm. Ova metoda je vrlo specifična, sa niskom razinom detekcije (LOD).

ELISA testovi ne zahtijevaju skupu opremu niti pripremu uzoraka u više koraka, a mogu se koristiti u rutinskim analizama većeg broja uzoraka. Dodatne prednosti te metode su preciznost, visoka osjetljivost, mali troškovi, kratko vrijeme analize i jednostavnost. Zbog tih prednosti ELISA testovi se mogu koristiti u određivanju akrilamida u različitim prehrambenim proizvodima (Oracz i sur., 2011).

2.2.2. Određivanje atrazina

U posljednje vrijeme postoji sve veći interes za primjenu imunoloških tehnika u određivanju zagađivača okoliša. Imunoenzimski testovi pri tome kombiniraju ogromne diskriminatorne karakteristike antitijela koja imaju visoki afinitet za specifični antigen ili hapten uz visoku katalitičku moć enzima (Pfeifer-Fukumura i sur., 1999).

Herbicidi se naširoko koriste u poljoprivredi, prije i poslije nicanja te kontrole usjeva i drugih biljaka. Zbog široke primjene, postavlja se pitanje o njihovoj rasprostranjenosti u okolišu.

Jedna od najistaknutijih skupina herbicida koja se koristi u Europi i SAD-u u posljednjih 30 godina su e-triazini, osobito atrazin. Zahvaljujući svojoj snazi i topljivosti u vodi, atrazin se smatra najčešćim onečišćivačem u Njemačkoj, čak i nakon njegove zabrane u travnju 1991. godine. Nedavne studije pokazuju kako se u tlu i dalje nalazi atrazin, kao i u površinskim vodama i kišama (Pfeifer-Fukumura i sur., 1999).

Atrazin i simazin su najčešće monoklor supstituirani te pripadaju e-triazin obitelji. Zbog visoke postojanosti u okolišu, akumulacijom e-triazina u tlu može doći do kontaminacije podzemnih voda. Štoviše, atrazini mogu biti štetni za određene rotacije usjeva i zbog toga tlo treba analizirati prije sadnje. Za potrebe analitičkih metoda određivanja, haptent-protein se dobiva pomoću derivata atrazina i simazina te se konjugira putem aminoheksanske karboksilne i tiopropionske karboksilne grupe. Na taj način proizvedena antitijela, imunizacijom kunića, omogućuju određivanje atrazina u uzorcima vode u rasponu od 0,02 do 5 μgL^{-1} izravnim ELISA testom (Franek i sur., 2005).

2.2.3. Određivanje antibiotika

Proizvodnja proizvoda ribarstva je naročito porasla u posljednjih nekoliko desetljeća, uglavnom zbog intenzivnog uzgoja. Različiti antibiotici koriste se za liječenje infekcija uzrokovanih raznim bakterijskim ribljim patogenima. Tetraciklini (TCs) su antibiotici širokog spektra koji se široko koriste u uzgoju i liječenju riba. Djeluju vrlo učinkovito pri niskim dozama i u potpunosti se izlučuju iz tijela u kratkom vremenu koje je poznato. Međutim, u nekim slučajevima mogu se akumulirati u prehrambenim proizvodima uzrokujući ozbiljnu prijetnju za ljudsko zdravlje, kao što su alergije, toksični učinci i otpornost bakterija na antibiotike. Štoviše, tetraciklini su utvrđeni u uzorcima vode iz okoliša kao i u stajskom gnoju i poljoprivrednim zemljištima.

Cháfer-Pericás i suradnici (2010) razvili su ELISA metodu za određivanje oksitetraciklina, jednog od najčešćih antibiotika, u ribi. Tijekom istraživanja uspoređena su dva različita načina detekcije te je utvrđeno kako su rezultati statistički usporedivi sa referentnom HPLC metodom. Razvijena brza metoda uz jednostavnu pripremu uzoraka može poslužiti kao "skrining" metoda za analizu velikog broja komercijalnih uzoraka ribe (Cháfer-Pericás i sur., 2010).

ELISA test je najčešće korištena orijentacijska metoda u kontroli određenih tvari i njihovih rezidua u životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla. Primjer određivanja koncentracije ostataka tetraciklina (TTC), oksitetraciklina (OTTC), klortetraciklina (CITTC) i doksiciklina (DTTC) u mišićnom tkivu životinja primjenom ELISA metode prikazan je u Tablici 1. (Makovec i sur., 2014)

Tablica 1. Određivanje rezidua tetraciklina (TTC), oksitetraciklina (OTTC), klortetraciklina (CITTC) i doksiciklina (DTTC) u uzorcima mišićnog tkiva goveda, kokoši, kunića, ovaca, patki, purana i svinja ELISA metodom (Makovec i sur., 2014)

Matriks	TTC ng/g	OTTC ng/g	CITTC ng/g	DTTC ng/g	Najniža granična konc. određivanja ng/g				Rezidui prema legislativi
					TTC	OTTC	CITTC	DTTC	
goveđi mišić	22,8477	38,087	5,71191	2,85596	46	56,5	49,6	64,1	Negativno
kokošji mišić	23,7123	39,5284	5,92807	2,96404	46	56,5	49,6	64,1	Negativno
mišić kunića	43,9494	43,9494	13,7342	6,86709	46	56,5	49,6	64,1	Negativno
ovčji mišić	44,7372	51,1283	15,9776	7,98879	46	56,5	49,6	64,1	Negativno
pačji mišić	31,2471	52,0889	7,81177	3,90589	46	56,5	49,6	64,1	Negativno
mišić purana	30,5098	50,8598	7,62745	3,81372	46	56,5	49,6	64,1	Negativno
svinjski mišić	32,4296	54,0601	8,1074	4,0537	46	56,5	49,6	64,1	Negativno

Kolistin ("colistin") je antibiotik kojeg proizvode pojedine vrste *Bacillus polymyxa*. Mješavina je cikličkih polipeptida kolistina A i B. Učinkovit je protiv većine gram-negativnih bakterija i koristi se kao polipeptidni antibiotik. Komercijalno su dostupna 2 oblika kolistina: kolistin sulfat i natrijev kolistinmetat.

Tijekom jednog od istraživanja, za određivanje kolistina korištena je indirektna ELISA tehnika kao "screening" metoda. Analiza je provedena na uzorcima kravljeg mlijeka. Primijenjena su poliklonalna antitijela. Osim antitijela, metoda zahtijeva i sljedeće reagense: colistin sulfat kao premaz, ovalbumin kao reagens za prekidanje reakcije, enzimski konjugat protutijela anti- kunića kao supstrat (Suhren i Knappstein, 2005).

Određivanje sulfonamida

Zbog alergijske ili toksične reakcije i široke primjene, mnogi imunološki testovi su razvijeni za otkrivanje sulfametazina. Osjetljiva imunološka ispitivanja na sulfametazin imaju granice detekcije, u puferu za analizu, i ispod 10 pgL^{-1} . Za razvoj izravnih i neizravnih ELISA formata s homolognim sustavom koriste se poliklonalna antitijela. Nekoliko vrsta uzoraka, kao što je svinjska plazma, mišić i jetra, su ispitani na sulfametazin pomoću ELISA metode. Postupci ekstrakcije i pročišćavanja za takove razvijene ELISA metode su jednostavniji od onih za instrumentalne metode. Razvijeni su također imunološki testovi za druge sulfonamide kao što su sulfamerazin, sulfadiazin, sulfadimidin, sulfadimetoksid, sulfaklororpiridazin, sulfatiazole i sulfasalazin. Mnogi uzorci, kao što su jaja, mlijeko, govedina, janjetina, svinjetina, pčelinji med i druge namirnice su istraženi pomoću ELISA metode.

Učestalost uporabe multi-sulfonamida, kao vrste lijekova koji se koriste za liječenje životinja, raste te se imunološke metode moraju usavršiti kako bi mogle detektirati niz različitih komercijalnih sulfonamida. Za detekciju sulfonamidnih skupina specifičnih za imunološka ispitivanja, razvijena su antitijela široke specifičnosti na aromatsku amino skupinu. Sulfonamidi su posebno otporni na pokušaje da se proizvede paleta specifičnih antitijela. To je vrlo iznenađujuće jer sulfonamidi posjeduju strukturu s relativno velikim zajedničkim prstenom koji na jednom kraju molekule izgleda vrlo pogodan za široko generiranje specifičnosti antitijela. Neki istraživači su opisali proizvodnju takvih antitijela, ali dobivena antitijela nisu pokazala tako veliku reaktivnost kakva se očekivala (Zhang i Wang, 2009).

2.2.4. Određivanje mikotoksina

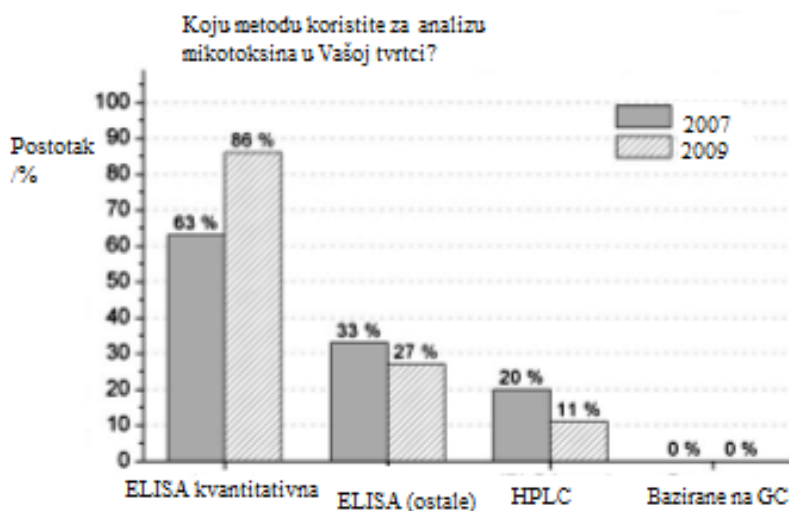
Mikotoksini su toksični sekundarni metaboliti iz roda gljivica, uključujući one vrste koje se kolokvijalno nazivaju plijesni. Takve gljivice su u mogućnosti zaraziti mnoštvo domaćina, kao na primjer žitarice, te se mikotoksini mogu naći na samom polju, u sirovinama tijekom skladištenja i prerade ili čak u završnom proizvodu.

U današnje vrijeme razvijeni su kvalitativni, polu-kvantitativni i kvantitativni ELISA setovi za određivanje mikotoksina, a brzina analize se obično smanjuje prema navedenom redoslijedu. U svakom slučaju, osnovna prednost ELISA tehnike je njezina prenosivost i jednostavnost uporabe u odnosu na stacionarni, kromatografski sustav, iako postoji velika

moгуćnost pojave lažno pozitivnih rezultata zbog unakrsnih reakcija ili lažno negativnih rezultata zbog inhibicije korištenih antitijela od strane komponenata matriksa.

Važno je napomenuti da se lažno pozitivni rezultati mogu pojaviti ne samo zbog uporabe setova razliĉitih proizvođaĉa na istom uzorku, već i takoĊer uporabom istog seta na razliĉitim uzorcima hrane (Siegel i sur., 2011).

Laboratorijske analize mikotoksina najĉešće ukljuĉuju HPLC (eng. High Performance Liquid Chromatography; HPLC) analize uz odgovarajuću detekciju kao takoĊer i masenu spektrometriju. Obzirom da mikotoksini nisu hlapljivi ukoliko nisu derivatizirani, plinsko kromatografske analize se rijetko koriste. Zbog predhodno navedenih prednosti, ELISA metode kao brze metode izbora u odnosu na kromatografske pronalaze svoju primjenu pri odreĊivanju mikotoksina kao što je vidljivo i na Slici 4. (Siegel i sur., 2011).



Slika 4. Usporedba uĉestalosti uporabe pojedinih metoda za odreĊivanje mikotoksina (Siegel i sur., 2011)

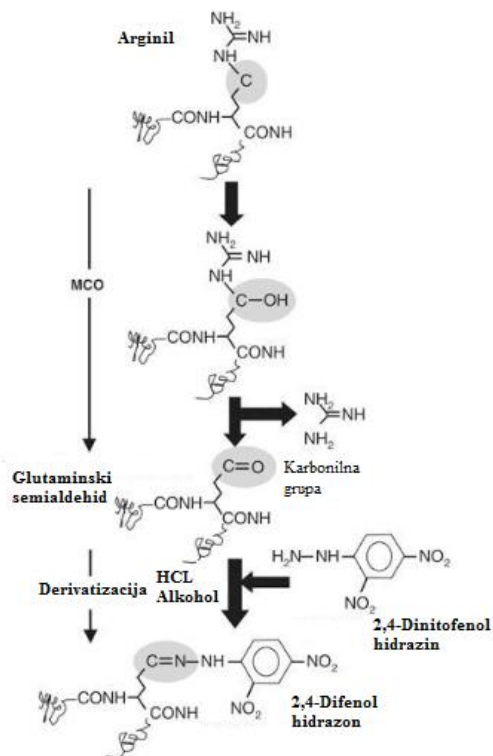
Aflatoksin M1 (AFM1) je jetreni kancerogeni metabolit pronaĊen u mlijeku životinja koje konzumiraju aflatoksin B1. M1 je relativno stabilan u sirovim i obraĊenim mlijeĉnim proizvodima i ne utjeĉe na pasterizaciju ili preradu u sir. MeĊutim, ako mlijeko sadrži ovaj mikotoksin i sir proizveden od tog mlijeka će takoĊer sadržavati taj mikotoksin. Razina aflatoksina u mlijeĉnim proizvodima je razliĉita obzirom na svojstva pojedinih sastojaka proizvoda. Mlijeko i mlijeĉni proizvodi se ĉesto koriste u prehrani ljudi, osobito djece. MeĊutim, ovi proizvodi mogu sadržavati i mikotoksine kao što je aflatoksin M1 te je stoga

potrebna kontrola razine mikotoksina u mlijeku kako bi se smanjio rizik. Za određivanje koncentracije aflatoksina u mlijeku koristi se i ELISA tehnika (Sarimehmetoglu i sur., 2004).

2.2.5. Određivanje karbonil proteina

Proteinska karbonilizacija je glavni oblik oksidacije proteina i široko se koristi kao pokazatelj oksidativnog stresa. Karbonilne skupine ne absorbiraju UV ili vidljivi dio spektra, te nemaju ni fluorescentne karakteristike te njihovu detekciju i kvantifikaciju možemo provesti samo pomoću specifičnih kemijskih proba.

Kvantifikacija karbonil proteina može se mjeriti pomoću imunoenzimskog testa (ELISA). Test uključuje upotrebu biotin povezanih anti-DNP antitijela koja ne samo da se vežu na obložene DNP-derivatizirane proteine, već olakšavaju detekciju sa streptavidinom. Prednost ELISA metode je da test treba samo mikrogramske količine proteina te se može mjeriti više uzoraka istovremeno (Yan i Forster, 2011).



Slika 5. Karbonilacija i derivatizacija aminokiselinskog postranog lanca proteina (Anonymous 1).

2.3. PRIMJENA ELISA METODA U PROCJENI AUTENTIČNOSTI PREHRAMBENIH PROIZVODA

Ispitivanje autentičnosti prehrambenih proizvoda, kao što su meso, mlijeko ili riba, važno je za označavanje i procjenu vrijednosti kvalitete hrane. Stoga se sve češće provode ispitivanja autentičnosti prehrambenih proizvoda prvenstveno radi zaštite potrošača ali i proizvođača.

Većina studija koje koriste imunološke tehnike za provjeru autentičnosti hrane je bazirano na primjeni ELISA testa. Ovaj postupak uključuje proizvodnju antitijela ili antiseruma koji se mogu vezati na protein od interesa, čime se omogućuje otkrivanje tog proteina, kvalitativno i kvantitativno. Glavna prednost ovog pristupa je da antitijela ili antiserum mogu biti proizvedena te da specifično odgovaraju proteinu, čime se omogućuje prepoznavanje i kvantifikacija isključivo tog proteina. U dosadašnjim ELISA principima su postojale poteškoće u proizvodnji antitijela koja su specifična za određeni protein. Međutim, to je relativno mala poteškoća kada se uzme u obzir selektivnost tehnike. Nedavna istraživanja pomoću ELISA tehnike uključivala su detekciju prisustva različitih vrsta mesa u prehrambenim proizvodima te prisutnost biljnih proteina u mlijeku u prahu. Ova tehnika pokazuje visok potencijal u procjeni autentičnosti prehrambenih proizvoda iako zahtijeva brojna poboljšanja (Sanchez i sur., 2002; Reid i sur., 2006).

2.3.1. Meso i mesni proizvodi

Identifikacija vrste mesa i podrijetla u uzorcima prehrambenih proizvoda provodi se u korist potrošača iz nekoliko razloga:

1. kako bi se onemogućio ekonomski gubitak uslijed neodgovarajućih zamjena ili primjesa
2. medicinskih zahtjeva pojedinaca predisponiranih na alergije na hranu
3. iz vjerskih razloga.

Dakle, pouzdani i osjetljivi analitički alati su potrebni za detekciju i identifikaciju sastojaka hrane i hrane za životinje. Metode bazirane na DNA tehnologiji te ELISA tehnike su najviše korištene metode za procjenu autentičnosti mesa. Metode na bazi DNA su najspecifičnije i najosjetljivije metode za identifikaciju različitih vrsta mesa, ali te metode zahtijevaju skupu

laboratorijsku opremu i određeni stupanj znanja. Naprotiv, ELISA je također i specifična i osjetljiva ali brža od genetskih metoda te se koristi za rutinsku analizu velikog broja uzoraka. Prema tome, ELISA metode su najčešće korištene metode za identifikaciju vrste mesa u posljednjih nekoliko godina. Pri tome se koriste antitijela za mišićne i serumske proteine životinjskog podrijetla ili termostabilne proteine (Asensio i sur., 2008).

Martin i suradnici (1998) su uspješno proveli kvantitativnu procjenu svinjskih primjesa u sirovom mljevenom mesu uz pomoć ELISA testa. Neke strateške tvrtke su razvile razne vrste ELISA testova koji detektiraju i identificiraju vrstu mesa u kuhanom, sirovom i termički obrađenom mesu sa primjesama te u hrani za životinje (Martin i sur., 1998; Asensio i sur., 2008).

U mesnim proizvodima se mogu detektirati proteini koji nisu podrijetlom mesni proteini, kao npr. sojini proteini, a koji se dodaju zbog svojih zanimljivih prehrambenih i funkcionalnih svojstava. Proteini soje se često dodaju u mesnu hranu i ne navedu na deklaraciji te tako dolazi do patvorenja. Ova patvorenja uzrokuju potencijalnu opasnost po zdravlje, posebno za osobe s alergijama. ELISA tehnike se koriste za identifikaciju ove zamjene proteina i sprječavaju namjerno ili nenamjerno povišenje cijene zbog visokog udjela "mesnih" proteina. Na primjer "chorizo", španjolska kobasica, se često supstituira sa sojom jer je proizvod snažnog okusa i lako se zamaskira okus sojinih proteina. Koppelman i suradnici (2004) su razvili „sendvič“ ELISA test, koji se primjenjuje za kvantifikaciju proteina soje i namirnica koje sadržavaju soju. Metoda omogućuje granicu kvantifikacije od 1 ppm pomoću poliklonalnih antitijela (Koppelman i sur., 2004; Asensio i sur., 2008).

2.3.2. Riba i riblji proizvodi

Sposobnost prepoznavanja vrste ribe i nakon uklanjanja vanjskih karakteristika preradom, poput konzerviranja, dimljenja ili filtriranja je jako teško. Iako je to prepoznavanje teško i odvija se uz dosta problema, vrlo je bitno u određivanju autentičnosti proizvoda. Nakon što su morfološke karakteristike tijekom prerade uklonjene, postoji velika opasnost da se dijelovi ribe ili prerađevina visoke kvalitete i visoke cijene, zamjene sa ribom ili dijelovima ribe koja je lošije kvalitete uz istu ili veću cijenu te lažnu deklaraciju.

Kako bi se spriječila patvorenja u preradi i prodaji ribe i ribljih proizvoda, laboratoriji za kontrolu hrane moraju posjedovati raspoložive tehnike za utvrđivanje određenih sastojaka. Identifikacija vrste ribe i ribljih prerađevina se u posljednjih nekoliko godina najčešće provodi ELISA tehnikom (koja je pogodna za rutinsku analizu velikog broja uzoraka) i metodama koje su bazirane na DNA tehnologiji. Međutim, ELISA tehnike su jeftinije i metode jednostavnije za provedbu od onih baziranih na DNA tehnologiji.

Općenito, sama identifikacija ribljih vrsta je teška i rijede se provodi najviše zbog raznolikosti vrsta riba. Ipak, u posljednjih nekoliko godina su proizvedena antitijela za mišićni protein srdele te više vrsta listova. U budućnosti će se vjerojatno puno raditi na razvoju ELISA metoda za identifikaciju vrste ribe (Asensio i sur., 2008).

2.3.3. Mlijeko i mliječni proizvodi

Dodatak jeftinijeg kravljeg mlijeka tijekom proizvodnje sira je uobičajena praksa, te može postati problem uslijed različitih razloga poput alergija, vjerskih stajališta te etičkih i kulturnih razlika ali i zbog zakonskih propisa.

Točno određena vrsta mlijeka mora se koristiti za proizvodnju određenih mliječnih proizvoda, na primjer ili isključivo kozje ili isključivo ovčje mlijeko, te je potrebna provjera kvalitete posebno ako se proizvode visoko kvalitetni sirevi od kojih su pojedini zaštićeni oznakom izvornosti. Ipak, kravljem mlijeku može biti dodano kozje ili ovčje mlijeko tijekom proizvodnje sira ili mliječnih prerađevina ali je to potrebno navesti na proizvodu. U tim slučajevima potrebno je navesti na deklaraciji vrste korištenog mlijeka u proizvodnji sira ili drugih mliječnih prerađevina u kojima je došlo do "narušavanja" izvornosti.

Dakle, iz pravnih razloga te u svrhu zaštite potrošača, na mliječnim proizvodima kao što su sirevi trebale bi se nalaziti vjerodostojne deklaracije. U tu svrhu, kao pouzdane i osjetljive analitičke metode, izdvajaju se ELISA metode.

ELISA metode predstavljaju i jedne od najčešće korištenih metoda za identifikaciju vrste mlijeka obzirom da su jednostavne za korištenje i brze. Hurley i suradnici (2004) su razvili neizravnu i konkurentnu ELISA metodu te "sendvič" ELISA metodu za otkrivanje dodataka niskih udjela kravljeg mlijeka u kozje ili ovčje mlijeko.

U drugoj studiji, Lo'pez-Calleja i suradnici (2006) primjenjuju indirektnu ELISA metodu, uz mAb protiv goveđeg b-kazeina, za kvantifikaciju kravljeg mlijeka u sirevima bez navedenog sadržaja kravljeg mlijeka na deklaraciji (Hurley i sur.,2004; Lo`pez-Calleja i sur., 2006; Asensio i sur., 2008).

2.3.4. Voćni sok

Kontrola kvalitete soka od agruma je od presudne važnosti jer se ti proizvodi mogu lako patvoriti. Sve je veći broj istraživanja koja se odnose na patvorenje voćnog soka, što ukazuje na značaj ovog relevantnog problema. Patvorenje se može temeljiti na jednostavnom razrjeđivanju vodom ili zamjenom sa jeftinijim umjetnim sastojcima (šećer, kiselina, bojila). Nadalje, zbog velikog broja informacija o kemijskom sastavu plodova, koriste se preciznije metode. Kako bi se osiguralo da potrošači zadrže povjerenje, potrebni su osjetljivi analitički alati za detekciju tvari koje sadrže voćni sokovi. U tu svrhu, Sass-Kiss i Sass (2002) su proizveli poliklonalna antitijela razvijena protiv karakterističnih peptida kore grejpa i naranče. Proizvedena antitijela koriste se u imunološkim testovima za detekciju stranih tvari u voćnim sokovima.

Od širokog raspona analitičkih metoda na raspolaganju, ELISA je dobro prilagođena za određivanje autentičnosti hrane obzirom da je osjetljiva i specifična te brza, jeftina i lako izvediva. Ulaganje u opremu je mnogo manje zahtjevno u odnosu na druge tehnike. Usprkos pojedinim nedostacima primjene ELISA tehnike u ovom području, ova metodologija može u kombinaciji sa drugim analitičkim tehnikama, potrošačima osigurati zaštitu od nepoštene prakse u prehrambenoj industriji (Asensio i sur., 2008).

2.4. PRIMJENA ELISA METODA U ODREĐIVANJU ALERGENA HRANE

U posljednje vrijeme prepoznat je problem pojave skrivenih alergena u hrani. Označavanje prisutnosti alergena na deklaracijama prehrambenih proizvoda najučinkovitiji je način omogućavanja osjetljivim, predisponiranim pojedincima da izbjegnu unos skrivenih alergena u organizam. Zbog toga je određivanje alergena u hrani veoma značajno kako za prehrambenu industriju, tako i za osobe s alergijama na hranu. Postoji jasna potreba za analitičkim

metodama koje su visoko specifične i osjetljive za određivanje čak i tragova alergena (Besler i sur., 2002).

Do danas je osmišljeno samo nekoliko validiranih metoda za otkrivanje ograničenog broja alergena iz hrane. Imunološko određivanje alergena hrane može uključivati bilo humane IgE iz seruma ili pak antitijela životinja. Imunoenzimski testovi trenutno predstavljaju najčešće metode koje se koriste za određivanje alergena u različitim prehrambenim proizvodima. Odgovarajuće vrijednosti parametara validacije, kao što su na primjer osjetljivost, specifičnost te granica detekcije, čine imunoenzimske metode pogodnima i učestalima za određivanje alergena u hrani.

Kako bi se odredili čak i tragovi alergena u hrani, potrebno je povećati osjetljivost ELISA metode, što je omogućeno uporabom biotiniliranih sekundarnih antitijela te streptavidin konjugirane peroksidaze. Nekoliko ELISA metoda je razvijeno za detekciju i kvantifikaciju bilo čitavih proteinskih ekstrakata hrane, bilo određenih prehrambenih alergena. Kvantifikacija ELISA metodom se provodi za razne namirnice poput: badema, kravljeg mlijeka, lješnjaka, kikirikija, soje, i pšenice. Alergeni se kvantificiraju u širokom koncentracijskom rasponu od tragova, niske koncentracije od 2 ppm, do nekoliko posto (Besler, 2001).

Za određivanje alergena hrane vrlo često se koriste "sendvič" ELISA testovi koji predstavljaju osjetljive testove kojima je moguće detektirati i kvantificirati koncentraciju specifičnih topljivih proteina. "Sendvič" ELISA može biti specifična obzirom da koristi antitijela za dva ili više različitih epitopa. Osnovni princip testa uključuje suvišak visoko pročišćenih specifičnih antitijela koja se adsorbiraju ili su "prevučena" na plastične mikrotitarske ploče. Imobilizirana antitijela služe za specifično hvatanje svojih odgovarajućih antigena, kao što su alergeni hrane, a koji su prisutni u uzorku. Nakon ispiranja nevezanog materijala, zaostali antigeni se detektiraju pomoću označenih antitijela. Rezultati mogu biti kvantificirani pomoću standardne krivulje pri čemu je, obzirom na princip "sendvič" ELISA testa, intenzitet promjene boje proporcionalan koncentraciji alergena u uzorku, odnosno što ima više alergena, intenzivnija je razvijena boja (Koppelman i sur., 2006).

Nedostaju sustavna istraživanja o učestalosti skrivenih alergena u hrani, međutim proveden je određen broj istraživanja na uzorcima hrane za koje je postojala sumnja da sadrže određene

alergene. Iako ti rezultati ne mogu biti reprezentativni, značajan broj namirnica sadrži skrivene alergene. Čak 43 % od 28 analiziranih uzoraka čokolada i čokoladnih proizvoda i žitarica sadrže skrivene količine proteina lješnjaka (Holzhauser i Vieths 1999). Skriveni proteini kikirikija detektirani su u 29 % od 17 analiziranih uzoraka (Holzhauser i Vieths 1999). Alergeni badema određeni su u 61 %, te lješnjaka u 72 % analiziranih uzoraka čokolade (Holzhauser, 1999; Bessler i sur., 2002).

2.5. PRIMJENA ELISA METODA U DETEKCIJI GMO-a

Napredak u molekularnoj biologiji i tehnikama sa rekombinantnom DNA su omogućili da se proizvede biljni genom. U usporedbi s tradicionalnim metodama oplemenjivanja bilja, kao što su umjetno križanje ili hibridizacija, biotehnologija sada omogućuje uvođenje DNA u biljku iz nekog vanjskog izvora. Selektivno uključivanje jednog ili više obilježja, može poslužiti i kako bi se poboljšala kvaliteta poljoprivrednih kultura. Većina genetski modificiranih (GM) usjeva su trenutno proizvedeni kako bi se poboljšao rast sa agronomske strane, bez herbicida ili štetnih nametnika. Međutim, potencijal GM biljaka nije ograničen samo na agronomsko poboljšanje, već može poslužiti i kao sredstvo za poboljšanje nutritivne vrijednosti hrane za stoku ili hrane za ljude.

Praćenje prisutnosti GM biljaka u raznim vrstama hrane za ljude i hrane za životinje je važno za zemlje s propisima o označavanju GM sorti biljaka. Osim toga, zemlje mogu testirati biljke na neodobrene GM vrste (Alexander i sur., 2007).

Hrana i sastojci hrane koji se dostavljaju krajnjem potrošaču, u kojima su prisutni bilo proteini ili DNK proizvedeni genetskim modifikacijama, su podvrgnuti dodatnim specifičnim zahtjevima označavanja. Na temelju te informacije, potrebno je regulirati prisutnost GMO-a u usjevima, hrani te sirovinama. Trenutna metodologija za analizu GMO usmjerena je na jedan od dva cilja, transgene DNA ili nove proteine dobivene u GM proizvodu. Većina metoda se temelji na detekciji DNA, ali se koriste i ELISA metode sa antitijelima koja se vežu na određeni protein. U cjelini, ELISA predstavlja metodu izbora za određenu GMO sirovinu, poluprocesiranu hranu i prerađene namirnice, pod uvjetom da protein nije denaturiran, i da se može detektirati. Međutim, budući da ELISA ima manju snagu detekcije od PCR metoda,

manje je osjetljiva za testiranje gotovih prehrambenih proizvoda s velikim brojem sastojaka posebno ako je prag detekcije nizak (Bonwick i Smith, 2004).

ELISA može dati kvantitativne podatke. Dva su primjenjiva imunološka testa za detekciju GM biljaka. Test „tok bočne trake“ i ELISA test. U komercijalne svrhe su dostupne obje vrste za otkrivanje brojnih GM usjeva jer otkrivaju proteine u biljkama koji odbijaju kukce te imaju toleranciju na herbicide. Međunarodna studija koja je uključila 38 laboratorija je pokazala veliku sposobnost ELISA testa za otkrivanje GM sorte soje preko ekspresije rekombinantnog proteina CP4 EPSPS. Pokus je osmišljen kako bi se ustvrdilo da li se ti specifični proteini u soji mogu detektirati iznad ili ispod praga od 20 mgg^{-1} (Alexander i sur., 2007).

U nekim slučajevima gdje pročišćeni ili rekombinantni antigeni nisu dostupni ili se veoma teško mogu dobiti ili su antitijela vrlo specifična pa su poželjne aminokiseline, kratki peptidi (hapteni) koji su konjugirani na proteinskom nosaču, se mogu koristiti za razvoj antitijela. Međutim, peptidna antitijela mogu biti reaktivna na denaturirane oblike proteina i zbog toga se češće primjenjuju u Western blotu (Grothaus i sur., 2006).

3. ZAKLJUČAK

1. Moderne imunološke metode razvijene su u svrhu određivanja složenih bioloških molekula. Visoka osjetljivost i visoka specifičnost reakcije antigen-antitijelo privlače pozornost znanstvenika koji primjenjuju ta svojstva u potrazi za poboljšanim analitičkim tehnikama. Imunoenzimska ELISA metoda predstavlja jedan od osnovnih testova u okviru imunoloških testova.
2. Imunoenzimski ELISA testovi dolaze u mnogim oblicima i imaju brojne primjene. Analitičarima su dostupni komercijalni testovi ili razvijaju specifične testove za svoje vlastite primjene. Između više različitih oblika ELISA testova, u analitici prehrambenih proizvoda najčešće se koristi tzv. "sendvič" ELISA test.
3. ELISA testovi obuhvaćaju široku primjenu te se često koriste za određivanje različitih kontaminanata u prehrambenim proizvodima. Posebnu pozornost privlači uporaba navedenih metoda u procjeni autentičnosti hrane. Također, brojne su prednosti uporabe ELISA testova u određivanju potencijalnih alergena hrane, a metodologija pronalazi i značajnu uporabu pri detekciji genetski modificiranih organizama.
4. Imunoenzimske ELISA metode pružaju neprocjenjiv alat za prehrambenog stručnjaka u okviru kontrole kvalitete i sigurnosti hrane.

4. LITERATURA

Alexander, T.W., Reuter, T., Aulrich, K., Sharma, R., Okine, E.K., Dixon, W.T., McAllister, T.A. (2007) A review of the detection and fate of novel plant molecules derived from biotechnology in livestock production. *Anim. Feed. Sci. Tech.* **133**, 31–62.

Anonymous 1 (2010) Karbonilizacija <http://labs.biologija.unios.hr/hr/clanovi/pdf/idhi.pdf>
Pristupljeno 25. lipnja.2016.

Asensio, L., Gonzáles, I., García, T., Martín, R. (2008) Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* **19**, 1–8.

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

Bonwick, G.A., Smith, C.J. (2004) Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Int. J. Food Sci. Tech.* **39**, 817-827.

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**, 90-101.

Cháfer-Pericas, C., Maquieira, A., Puchades, R., Miralles, J., Moreno, A., Pastor-Navarro, N., Esponos, F. (2010) Imunochemical determination of oxytetracycline in fish : Comparison between enzymatic and time-resolved fluorometric assays. *Anal. Chim. Acta* **662**, 177–185.

Franek, M., Hruska, K. (2005) Antibody based methods for environmental and food analysis: a review. *Vet. Med.-Czech.* **50**, 1-10.

Graham, J.L., Jones, J.R., Jones, S.B., Downing, J.A., Clevenger, T.E. (2004) Environmental factors influencing microcystin distribution and concentration in the Midwestern United States. *Water Res.* **38**, 4395–4404.

Grothaus, G.D., Bandla, M., Currier, T., Giroux, R., Jenkins, G.R., Lipp, M., Shan, G., Stave, J.W., Pantella, V. (2006) Immunoassay as an analytical tool in agricultural biotechnology. *J. AOAC Int.* **89**, 913-928.

Holzhauser, T., Wangorsch, A., Vieths, S. (1999) *Rapid Methods for Biological and Chemical Contaminants in Food and Feed*, 1. izd., A. Van Amerogen, New York.

Hurley, I.P., Coleman, R.C., Ireland, H.E., Williams, J.H. (2004) Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *J. Dairy. Sci.* **87**, 543-549.

Kindt, T.J. (2006) *Kuby immunology*, 1. izd., W.H Freeman and company, New York

Koppelman, S.J., Hefle, S.L. (2006) *Detecting allergens in food*, 1. izd., CRC Press, Boca Raton, Boston, New York, Washington DC; Woodhead Publishing Limited, Cambridge England.

Koppelman, S.J., Lakemond, C.M., Vlooswijk, R., Hefle, S.L. (2004) Detection of soy protein in processed food: literature overview and new experimental work. *J. AOAC Int.* **87**, 1398-1407.

López-Calleja, J.M., Gonzáles, I., Fajardo, V., Hernández, P.E., García, T., Martín, R. (2006) Application of an indirect ELISA and a PCR technique for detection of cows' milk in sheep's and goats' milk cheeses. *Int. Dairy. J.* **17**, 87-93.

Makovec, S., Kos, B., Šušković, J., Bilandžić, N. (2014) Tetracycline antibiotics and determination of their residues in food. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **9(1-2)**, 7-16.

Martin, D.R., Chan, J., Chiu, J.Y. (1998) Quantitative evaluation of pork adulteration in raw ground beef by radial immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food. Protect.* **61**, 1686-1690.

Oracz, J., Nebesny, E., Zyzelewicz, D. (2011) New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta* **86**, 23–34.

Pfeifer-Fukumura, U., Hartmann, I., Holthues, H., Baumann, W. (1999) New developments in immunochemical water analysis down to 30 ml sample volume. *Talanta* **48**, 803–819.

Reid, L.M., O'Donnell, C.P., Downey, G. (2006) Recent technological advances for the determination of food authenticity. *Trends. Food. Sci. Tech.* **17**, 344–353.

Runje, M, Cvrtila, Ž. (2006) ELISA u analitici hrane. *Meso.* **7**, 92-94.

Sánchez, L., Pérez, M.D., Puyol, P., Calvo, M., Brett, G. (2002) Determination of vegetal proteins in milk powder by enzyme-linked immunosorbent assay: Interlaboratory study. *J. AOAC. Int.*, **85** , 1390–1397

Sarimehmetoglu B., Kuplulu O., Celik T.H. (2004) Detection of aflatoxin M1 in cheese samples by ELISA. *Food. Cont.* **15**, 45-49

Sass-Kiss, A., Sass, M. (2002) Distribution of various peptides in citrus fruits (grapefruit, lemon and orange). *J. Agric. Food. Chem.* **50**, 2117-2120.

Siegel, D., Babuscio, T. (2011) Mycotoxin management in European cereal trading sector. *Food. Cont.* **22**, 1145-1153.

Suhren G., Knappstein K. (2005) Detection of colistin in spiked and incurred milk samples by LC- and ELISA-technique. *Anal. Chim. Acta.* **529**, 97-101

Yan, L.J., Forester, M.J. (2011) Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *J.Chromatogr. B.* **879**, 1308–1315.

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