

# Određivanje količine glutena u bezglutenskim proizvodima ELISA metodom

---

Šarić, Nita

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:439804>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2017.

Nita Šarić

806/N

**ODREĐIVANJE KOLIČINE  
GLUTENA U BEZGLUTENSKIM  
PROIZVODIMA ELISA  
METODOM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane na Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Martine Bituh, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## **ZAHVALA**

Na samom početku zahvalila bih se svojim roditeljima, Nenadu i Ljiljani, koji su mi omogućili bezbrižno školovanje u Zagrebu. Bez njih, njihove pomoći i vjetra u leđa svega ovog ne bi bilo. Posebne zahvale uz moje roditelje zaslužuju i moje sestre, Nina i Nela, koje su me zajedno s roditeljima bodrile, ohrabrivale i bile uvijek tu za mene tokom učenja, prije ispita i poslije ispita, kao i tijekom izrade diplomskog rada. Također, hvala mojim prijateljicama, dečku i kolegicama na koje sam se mogla osloniti u svakom trenutku. Zahvaljujem i mentorici doc.dr.sc. Martini Bituh, kao i svim profesorima, docentima i tehničarkama sa Zavodu za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda, koji su bili spremni pomoći u svakom trenutku tokom izrade diplomskog rada. I na samom kraju zahvalila bih svim profesorima, docentima, asistentima i tehničarima Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta koji su, kroz pet godina mog školovanja, prenosili svoje znanje i pritom doprinijeli mom razvoju.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda  
Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Nutricionizam

### ODREĐIVANJE KOLIČINE GLUTENA U BEZGLUTENSKIM PROIZVODIMA ELISA METODOM

*Nita Šarić, 806/N*

**Sažetak:** U ovom istraživanju je uz pomoć ELISA (eng. *Enzyme – Linked Immunosorbent Assay*) testa određen udio glutena u bezglutenskim proizvodima iz različitih ugostiteljskih objekata (slastičarnice, prodavaonice brze hrane, restorani) i prodavaonica u kojima se prodaju bezglutenski proizvodi hrvatskog podrijetla. Među dvadeset i sedam različitih uzoraka iz skupina slastica, složenih jela i pekarskih proizvoda udio glutena prisutan je u rasponu od manje od  $5 \text{ mgkg}^{-1}$ , odnosno ispod limita kvantifikacije, do  $145,91 \text{ mgkg}^{-1}$ . Od dvadeset i sedam uzoraka u četiri uzorka udio glutena je iznad  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ , te se kao takvi ne mogu smatrati proizvodima „bez glutena“. Također, proveden je upitnik među kuharima/icama i poslužiteljima/icama u različitim ugostiteljskim objektima kako bi se ispitalo njihovo znanje o glutenu, bezglutenskoj prehrani, kao i o načinu rukovanja bezglutenskim namirnicama i pripremi bezglutenskih proizvoda. Iako je upitnik proveden na malom broju ispitanika, uočena je potreba edukacije zaposlenika ugostiteljskih objekata koji u svojoj ponudi imaju bezglutenske proizvode.

**Ključne riječi:** gluten, bezglutenska prehrana, bezglutenski proizvodi, kontaminacija, ELISA,

**Rad sadrži:** 64 stranice, 20 slika, 6 tablica, 170 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Doc.dr.sc. Martina Bituh

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. Nada Vahčić
2. Doc.dr.sc. Martina Bituh
3. Prof.dr.sc. Ines Panjkota Krbavčić
4. Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković (zamjena)

**Datum obrane:** 06. studenog 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

### DETERMINATION OF GLUTEN IN GLUTEN-FREE PRODUCTS

#### BY ELISA METHOD

*Nita Šarić, 806/N*

**Abstract:** In this study, the proportion of gluten in gluten-free products from various catering establishments (pastry shop, fast food, restaurants) and stores selling gluten-free products of Croatian origin was determined by the ELISA (*Enzyme – Linked Immunosorbent Assay*) test. Among the twenty seven different samples in a group of pastries, compound dishes and bakery products, the gluten content is present in the range of less than 5 mgkg<sup>-1</sup>, or below the quantification limit up to 145,91 mgkg<sup>-1</sup>. Out of twenty seven samples, four samples have the gluten content above 20 mgkg<sup>-1</sup>, and as such they cannot be considered as „gluten – free“ products. Also, a questionnaire was conducted among cooks and servers in various catering establishments to examine their knowledge about gluten, gluten-free diet, as well as how to treat gluten-free foodstuff and prepare gluten-free products. Although the questionnaire was conducted on a small number of examiners, the need to educate the employees of catering establishments that offer gluten-free products is noticed.

**Keywords:** gluten, gluten – free diet, gluten – free products, contamination, ELISA

**Thesis contains:** 64 pages, 20 figures, 6 tables, 170 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Martina, Bituh, Assistant Professor

**Reviewers:**

1. PhD. Nada, Vahčić, Full Professor
2. PhD. Martina, Bituh, Assistant Professor
3. PhD. Ines, Panjkota Krbavčić, Full Professor
4. PhD. Ksenija, Marković, Associate Professor (substitute)

**Thesis defended:** 6 November 2017

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. GLUTEN.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. POREMEĆAJI IZAZVANI GLUTENOM.....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Celijakija.....	5
2.2.1.1. <i>Oblici celijakije i simptomi.....</i>	6
2.2.1.2. <i>Dijagnoza celijakije.....</i>	7
2.2.2. Dermatitis herpetiformis .....	7
2.2.2.1. <i>Klinička slika dermatitis herpetiformisa .....</i>	8
2.2.2.2. <i>Dijagnoza dermatitis herpetiformisa.....</i>	8
2.2.3. Glutenska ataksija.....	8
2.2.3.1. <i>Klinička slika glutenske ataksije.....</i>	9
2.2.3.2. <i>Dijagnoza glutenske ataksije.....</i>	9
2.2.4. Alergija na pšenicu .....	9
2.2.4.1. <i>Oblici alergije na pšenicu i simptomi.....</i>	10
2.2.4.2. <i>Dijagnoza alergije na pšenicu.....</i>	11
2.2.5. Preosjetljivost na gluten.....	11
2.2.5.1. <i>Klinička slika preosjetljivosti na gluten .....</i>	12
2.2.5.2. <i>Dijagnoza preosjetljivosti na gluten.....</i>	12
<b>2.3. BEZGLUTENSKA PREHRANA .....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Informiranje potrošača o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani .....	13
2.3.1.1. <i>Opći uvjeti .....</i>	13
2.3.1.2. <i>Dodatni zahtjevi za hranu koja sadržava zob.....</i>	13
2.3.2. Bezglutenska prehrana.....	13
2.3.2.1. <i>Nutritivna vrijednost bezglutenskih proizvoda .....</i>	15
2.3.2.2. <i>Uvrštavanje zobi u bezglutensku prehranu.....</i>	16
<b>2.4. KONTAMINACIJA BEZGLUTENSKE HRANE .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5. METODA ODREĐIVANJA GLUTENA .....</b>	<b>20</b>
2.5.1. ELISA metoda .....	20
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. MATERIJAL.....</b>	<b>24</b>
3.1.1. Uzorci .....	24
3.1.2. Upitnik.....	25
3.1.3. Kemikalije .....	26
3.1.4. Laboratorijska oprema i pribor .....	26
<b>3.2. METODE RADA.....</b>	<b>28</b>
3.2.1. Princip rada s ELISA kitom.....	29
3.2.1.1. <i>Ekstrakcija uzorka Cocktail (patentirana) otopinom .....</i>	29
3.2.1.2. <i>Centrifugiranje i odvajanje supernatanta .....</i>	29



3.2.1.3. Priprema testa .....	29
3.2.1.4. Izvođenje testa .....	30
3.2.1.5. Očitanje na čitaču .....	31
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1. UDIO PROTEINA GLUTENA ODREĐEN ELISA TESTOM U BEZGLUTENSKIM     PROIZVODIMA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2. UPITNIK O GLUTENU I BEZGLUTENSKIM PROIZVODIMA .....</b>	<b>37</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>47</b>
<b>6.LITERATURA .....</b>	<b>48</b>

# 1. UVOD

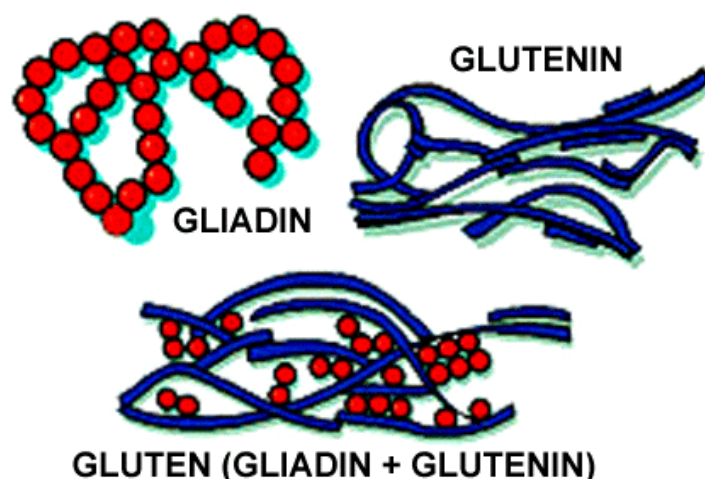
Bezglutenska prehrana predstavlja prehranu iz koje se izostavlja protein gluten, odnosno namirnice koje sadrže pšenicu, ječam i raž, dok je pitanje konzumiranja zobi još uvijek kontroverzno. Dok u današnje vrijeme pojedinci samovoljno započinju s provođenjem bezglutenske prehrane, ne iz zdravstvenih razloga već kao životni stil, pojedine osobe ipak ju moraju slijediti iz zdravstvenih razloga. Poznato je da gluten može izazvati različite poremećaje, kao što su celijakija, dermatitis herpetiformis, glutenska ataksija, alergija na pšenicu i preosjetljivost na gluten. Iz tog razloga, bezglutenska prehrana je jedini način liječenja, kako u pacijenata s celijakijom, tako i u ostalim poremećajima povezanim s glutenom. Međutim, ponekad je teško provoditi striktnu bezglutensku prehranu, s obzirom da gluten može biti skriveni sastojak različitih proizvoda, a kontaminirane mogu biti i žitarice koje prirodno ne sadrže gluten. Nadalje do kontaminacije može doći prilikom pripreme bezglutenskih proizvoda, zbog kontaminirane radne površine, korištenja kontaminiranog pribora i posuđa, pripremanja bezglutenskih proizvoda u istim prostorijama gdje se pripremaju proizvodi s glutenom i slično, ali i neznanja i nedovoljne educiranosti o tome u kakvim se uvjetima trebaju pripremati bezglutenski proizvodi. Stoga se postavlja pitanje sigurnosti bezglutenskih proizvoda koje osobe mogu konzumirati izvan svog doma.

Cilj ovog istraživanja bit će uz pomoć ELISA testa odrediti udio proteina glutena u bezglutenskim proizvodima iz različitih ugostiteljskih objekata (slastičarnice, prodavaonice brze hrane, restorani) i prodavaonica u kojima se prodaju bezglutenski proizvodi hrvatskog podrijetla. Udio glutena odrediti će se u slasticama, složenim jelima i pekarskim proizvodima koji su ili vidljivo navedeni kao proizvodi bez glutena, ili su prema sastavu prirodno bezglutenski, ili je od strane kuhara/ica ili poslužitelja/ica usmeno rečeno da su proizvodi bezglutenski. Također, provest će se upitnik među kuharima/icama i poslužiteljima/icama u različitim ugostiteljskim objektima kako bi se ispitalo njihovo znanje od glutenu, bezglutenskoj prehrani, kao i načinu rukovanja bezglutenskim namirnicama i pripremi bezglutenskih proizvoda.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. GLUTEN

Gluten je zajednički naziv koji opisuje kompleksnu smjesu proteina prisutnih u pšenici, raži, ječmu i zobi (Colgrave i sur., 2017), a u svrhu standarda Codex Alimentarius, gluten se definira kao proteinska frakcija iz pšenice, raži, ječma, zobi ili njihovih križanih sorti i njihovih derivata, na koju su neke osobe intolerantne i koja je netopiva u vodi i 0,5M NaCl (Codex Alimentariusu, 1979 rev. 2008). Gluten je toplinski stabilan (Biesiekierski, 2017), te se proteini glutena nazivaju prolamini, zbog značajnog udjela aminokiselinskih ostataka glutamina i prolina prisutnih u primarnoj strukturi (Balakireva i Zamyatnin, 2016). Udio glutamina i prolina je značajno visok (30% i 15% svih aminokiselina, redom) (Schumann i sur., 2017). Proteini, koji tvore gluten, glavni su skladišni proteini i predstavljaju između 70% i 80% ukupnog sadržaja proteina zrna (Scherf i sur., 2016). Prolamini pšenice prvi su identificirani proteini glutena (Balakireva i Zamyatnin, 2016), a tradicionalno, proteini glutena podijeljeni su u približno jednake frakcije prema njihovoj topivosti u alkohol-voda otopini glutena (na primjer 60%-tnog etanola): topljivi glijadini i netopljivi glutenini (Wieser, 2007). Odnosno, gluten je sastavljen od smjese monomernih glijadina i polimernih podjedinica glutenina (Elli i sur., 2017), što je prikazano na Slici 1.



Slika 1. Struktura glutena (Anonymous 1)

Prolamini prisutni u raži, ječmu i zobi zovu se sekalini, hordeini i avenini, redom (Elli i sur., 2017). Svi prolamini su srodni, i obično se svrstavaju u tri široke grupe: sumporom bogati (S-bogati), sumporom-siromašni (S-siromašni) prolamini i prolamini visoke molekulske mase (Shewry i Halford, 2002), što je detaljnije prikazano u Tablici 1.

Prihvaćeno je da su glijadini podijeljeni u četiri velike grupe (od najveće pokretljivosti prema najsporijoj):  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\omega$ -glijadini, prema njihovoj elektroforetskoj pokretljivosti u SDS-PAGE, pri niskom pH (Wieser, 2007). Proteini iz  $\alpha$ - i  $\beta$ -grupe su slični, stoga se ta grupa navodi kao  $\alpha$ -glijadini (Žilić i sur., 2011). Gluteinini su puno veći od glijadina i podijeljeni su u proteine visoke molekulske mase (VMM) i niske molekulske mase (NMM), prema njihovoj pokretljivosti na A-PAGE (Malalgoda i Simsek, 2017). Kada se brašno koje sadrži gluten pomiješa s vodom, tijesto dobiva viskoznost i elastičnost zbog aktivnosti glijadina i glutenina (Blomfeldt i sur., 2011). Omjer glijadina naprema gluteninu utvrđen je kao jedan od odlučujućih faktora za reologiju tijesta, pa tako optimalan omjer glijadina i glutenina rezultira stvaranjem jake mreže tijesta (Khatkar i sur., 1995).

Hordeini su podijeljeni u četiri grupe: B-, C-, D- i  $\gamma$ -hordeini (Huang i sur., 2016), i oni su bogati hidrofobnim aminokiselinama, što dovodi do visoke površinske hidrofobnosti i snažne proteinske agregacije. Kao takvi, ovi proteini su važni u stabilizaciji pjene i emulzije (Zhao i sur., 2010). Prolamini raži podijeljeni su u tri razreda: sekalini visoke molekulske mase,  $\gamma$ -sekalini i  $\omega$ -sekalini (Kreis i sur., 1985), a ti proteini nisu u mogućnosti stvoriti trodimenzionalnu mrežu zbog strukturnih i kompozicijskih razlika (Gellrich i sur., 2003).

Ukupan udio proteina i kumulativni udio prolina i glutamina u proteinima zobi je relativno manji, nego kod pšenice (Anderson, 2014) pa je to razlog nemogućnosti podjele prolamina zobi u grupe proteina visoke molekulske mase, S-bogate i S-siromašne (Balakireva i Zamyatnin, 2016). Aveini su se pokazali kao homolozi  $\alpha/\beta$ -glijadinu,  $\gamma$ -glijadinu pšenice, B-hordeinu ječma i  $\gamma$ -sekalinu raži (grupa S-bogati) (Chesnut i sur., 1989). Korištenje zobi u pečenim proizvodima ograničeno je zbog nemogućnosti zobenog brašna u oblikovanju kohezivnog, viskoelastičnog tijesta, kao što je glutenska mreža pšeničnog tijesta (Huang i sur., 2010).

Tablica 1. Klasifikacija prolamina glutena (Balakireva i Zamyatnin, 2016)

Vrsta žitarica	Sastavni dijelovi	Molekulska masa (% ukupne)	Polimeri ili Monomeri
<b>Prolamini VMM</b>			
<b>Pšenica</b>	VMM podjedinice glutenina	65-90 kDa (6%-10%)	Polimeri
<b>Ječam</b>	D-hordeini	>100 kDa (2%-4%)	Polimeri
<b>Raž</b>	VMM sekalini	>100 kDa (2%)	Polimeri
<b>S-bogati prolamini</b>			
<b>Pšenica</b>	$\gamma$ -glijadini	30-45 kDa (70%-80%)	Monomeri
	$\alpha$ -glijadini		Monomeri
	B- i C-tip NMM podjedinica glutenina		Polimeri
<b>Ječam</b>	B-hordeini i $\gamma$ -hordeini	32-45 kDa (80%)	Agregirani tip, monomeri ili jednolančani polipeptidi
<b>Raž</b>	$\gamma$ -sekalini	40-75 kDa (80%)	Polimeri
<b>S-siromašni prolamini</b>			
<b>Pšenica</b>	$\omega$ -glijadini	30-75 kDa (11%-20%)	Monomeri
	D-tip NMM podjedinice glutenina		Agregirani tip, polimeri
<b>Ječam</b>	C-hordeini	40-72 kDa (10%-15%)	Monomeri
<b>Raž</b>	$\omega$ -sekalini	48-55 kDa (10%-15%)	Monomeri
<b>Ostali prolamini glutena</b>			
<b>Zob</b>	Avenini	18,5-23,5 kDa (10%)	Monomeri

## 2.2. POREMEĆAJI IZAZVANI GLUTENOM

Visoki sadržaj prolina čini gluten otpornim na degradaciju gastrointestinalnim enzimima (proteazama) i tako omogućuje da veliki imunogenični glutenski peptidi dopru do površine sluznice i potaknu razvoj upalne reakcije (Tjon i sur., 2010; Balakireva i Zamyatnin, 2016). Svi proteini glutena (glijadin i glutenin, hordein, sekalin i avenin) imaju vlastite skupine toksičnih i imunogenih peptida (ili epitopa) s različitim imunogenostima. Međutim, poznato je da su glijadinski peptidi najtoksičniji i brojni, osobito izvedeni iz  $\alpha$ - i  $\gamma$ -glijadina. Pritom fragment duljine od 33 aminokiseline iz  $\alpha$ -glijadina uzrokuje najjači i najčešći odgovor stečenog imunološkog sustava (van Heel i West, 2006; Balakireva i Zamyatnin, 2016).

Danas je poznato da gluten može izazvati različite poremećaje koji se, prema konsenzusu stručnjaka, objavljenom 2012. godine, dijele u tri osnovna oblika: autoimuni (celijakija, dermatitis herpetiformis i glutenska ataksija), alergijski (alergija na pšenicu) i ne-autoimunski ne-alergijski (preosjetljivost na gluten) (Sapone i sur., 2012).

### 2.2.1. Celijakija

Celijakija je autoimuni poremećaj koji se pojavljuje kod genetski predisponiranih pojedinaca koji razvijaju imunološku reakciju na gluten. Bolest prvenstveno zahvaća tanko crijevo, ali kliničke manifestacije su širokog spektra, s intestinalnim i ekstraintestinalnim simptomima (Lebwohl i sur., 2015). Zajedničko obilježje svih pacijenata koji pate od celijakije je prisutnost varijabilnih kombinacija kliničkih manifestacija, specifičnih protutijela (protutijela na tkivnu transglutaminazu (tTG) ili TG2, antiendomizijska protutijela (EMA)), humanih leukocitnih antigena (HLA) – DQ2 i/ili – DQ8 halotipova (prisutnih u 90 – 95% pacijenata s celijakijom) i stupnjevi enteropatije koji variraju od limfocitne infiltracije epitela do potpune atrofije crijevnih resica (Sollid i Jabri, 2011). Imunološki odgovor na gluten u ovom poremećaju uključuje i stečeni i urođeni imunološki sustav (Sollid, 2002), te nakon izlaganja glutenu izaziva se upalna kaskada u sluznici tankog crijeva, što dovodi do atrofije crijevnih resica, hiperplazije kripti i povećanog broja limfocita u lamini proprijji (Lotta i sur., 2016). Isto tako, dolazi do malapsorpcije nekih važnih nutrijenata kao što su: željezo, folna kiselina, kalcij i vitamini topljivi u mastima (Kelly i sur., 1990; Matek i sur., 1999).

Obično se pojavljuje u ranom djetinjstvu (Gujral i sur., 2012), međutim, dok se u nekih osoba celijakija pojavi ubrzo nakon uvođenja glutena u prehranu, kod nekih se pojavi u kasnoj odrasloj dobi, nakon što su bili izloženi glutenu desetljećima (Sanz, 2015). Celijakija je jedan od najčešćih doživotnih poremećaja u zemljama pretežno naseljenim ljudima

europskog podrijetla, koji zahvaća oko 1% opće populacije (Lionetti i sur., 2015a). Prava prevalencija vjerojatno je puno viša (Mustalahti i sur., 2010), jer u većina pacijenta diljem svijeta celijakija još uvijek nije dijagnosticirana (Lionetti i sur., 2015a). Epidemiološka istraživanja provedena u Hrvatskoj, u Međimurskoj županiji, pokazuju da učestalost oboljelih iznosi 1:519 živorođene djece (Matek i sur., 1999).

### 2.2.1.1. Oblici celijakije i simptomi

Klinička slika celijakije vrlo je promjenjiva i individualno specifična (Lotta i sur., 2016). Osnovni oblici celijakije su klasična, atipična, „tiha“ i latentna celijakija (Bartusek i sur., 2007). Početak simptoma kod *klasične (ili tipične) celijakije* (Fasano i Catassi, 2001) općenito se javlja između 6. i 24. mjeseca života (Starčević Čizmarević i sur., 2015), nakon uvođenja hrane koja sadrži prolamine, kada dolazi do progresivnog gubitka tjelesne mase (Fasano i Catassi, 2001). Ona opisuje pacijente s klasičnim obilježjima intestinalne malapsorpcije gdje su se u potpunosti razvili atrofija crijevnih resica i ostale klasične histološke značajke (Rostom, 2006). Nadalje, tipično je karakterizirana kroničnim proljevom, anoreksijom, nenapredovanjem, nadutosti trbuha i gubitkom mišića (Fasano i Catassi, 2001), a javljaju se i anemija te steatoreja (Ludvigsson i sur., 2013). Također, mnogo djece s klasičnom celijakijom i malapsorpcijom pokazuju znakove promjene raspoloženja i letargije (Dewar i Ciclitira, 2005). Kod *atipične celijakije* pacijenti uglavnom imaju malo ili uopće nemaju gastrointestinalne simptome, ali općenito imaju potpuno razvijenu atrofiju crijevnih resica (Rostom, 2006). Od simptoma javljaju se anemija zbog nedostatka željeza, osteoporoza, niski rast, hipoplazija zubne cakline, artritis i artralgija, kronični hepatitis, neurološki problemi (Fasano i Catassi, 2001), neplodnost (Farthing i sur., 1983) i ponavljajući pobačaji (Gasbarrini i sur., 2000). Osim toga, javljaju se i disfunkcije jetre (Franzese i sur., 2001) i štitnjače (Elfstrom i sur., 2008). „*Tiha*“ *celijakija* ili *asimptomatska* (Ludvigsson i sur., 2013), odnosi se na asimptomatske pacijente kod kojih je otkriveno da imaju atrofiju crijevnih resica, izazvanu glutenom (Rostom, 2006). U većini slučajeva ona je otkrivena probirom (screening) u naočigled zdravih osoba (Fasano i Catassi, 2001), nakon serološkog pregleda ili možda tijekom endoskopije i biopsije iz nekog drugog razloga (Rostom, 2006). Takvi pacijenti ne pokazuju jasne gastrointestinalne simptome ili povezane atipične karakteristike celijakije kao što su nedostatak željeza ili osteoporoza (Rostom, 2006). Nadalje, *latentna celijakija* javlja se u pacijenta s pozitivnim serološkim testovima i trenutno

normalnom crijevnom sluznicom (Rostom i sur., 2004), ali kod kojih se kasnije može razviti aktivni oblik bolesti (Rostom, 2006).

Autoimuni poremećaji povezani s celijakijom uključuju i dijabetes melitus ovisan o inzulinu i hipotiroidizam (Neuhausen i sur., 2008; Meloni i sur., 2009), a nedavna istraživanja pokušavaju povezati celijakiju s koronarnom bolesti srca i cerebrovaskularnom bolesti (Heikkila i sur., 2015). Također, kao autoimuna bolest povezana s mnogim hiperkoagulacijskim stanjima, pacijenti s celijakijom imaju povećani rizik od tromboembolijskih događaja (Lerner i Blank, 2014). Stoga, rana dijagnoza bolesti je važna za sprječavanje atrofije crijevnih resica koja predisponira za teške komplikacije (Lotta i sur., 2016).

#### *2.2.1.2. Dijagnoza celijakije*

U dijagnostici celijakije pet je važnih elemenata koji omogućavaju adekvatno provođenje dijagnostičkog postupka: klinička sumnja na celijakiju, serološki testovi, patohistološka analiza sluznice tankog crijeva, genska analiza DQ2DQ8-heterodimera i pozitivan klinički odgovor na bezglutensku prehranu (Čuković – Čavka i sur., 2013).

#### *2.2.2. Dermatitis herpetiformis*

Dermatitis herpetiformis, također znan kao Dhuringova bolest (Scherf i sur., 2016) je kožna manifestacija celijakije koju karakterizira osip i patognomonični kožni IgA depozit (Salmi i sur., 2011). Sardy i sur. (2002), pokazali su kako je autoantigen za kožne IgA depozite epidermalna transglutaminaza (TG3), koja je enzim tipično ekspresiran u epidermi i usko je povezana, ali ne i identična TG2. Može se pojaviti u bilo kojoj dobi (Alonso-Llamazares i sur., 2007), a najčešće u trećem desetljeću (Caproni i sur., 2009), te se vrlo rijetko javlja kod djece mlađe od 3 godine (Reunala, 2001). Za razliku od celijakije, dermatitis herpetiformis nešto je češća kod muškaraca, nego kod žena (Oxentenko i Murray, 2003), u omjeru 1,5 do 1,9:1 (Sapone i sur., 2012). Prevalencija dermatitisa herpetiformisa je oko 1:10.000 u Velikoj Britaniji i SAD-u, iako je veća učestalost (4-6:10.000) zabilježena u Švedskoj i Finskoj (Sapone i sur., 2012; Salmi i sur., 2011).



### *2.2.2.1. Klinička slika dermatitis herpetiformisa*

Tipični simptomi su intenzivan svrbež i pečenje kože (Scherf i sur., 2016), a lezije kože sastoje se od eritematoznih papula, malih vezikula, ogoljenja i ožiljka koji je često hiperpigmentiran (Herrero-Gonzales, 2010). Osip može biti proširen, ali i ograničen na jedno do dva mjesta (Sapone i sur., 2012), a najčešće su zahvaćeni laktovi (90%), koljena (30%), ramena, stražnjica, sakralna regija i lice (Caproni i sur., 2009). Iako samo 10% pacijenata ima probavne tegobe i to najčešće blage, atrofija resica sluznice tankog crijeva nalazi se u 65%-75% pacijenata s dermatitisom herpetiformisom. Također, pacijenti s dermatitisom herpetiformisom mogu pokazivati isti niz manifestacije, povezanih poremećaja i komplikacija kao i u pacijenata s celijakijom (autoimune bolesti, anemiju, osteoporozu i zloćudne bolesti) (Sapone i sur., 2012).

### *2.2.2.2. Dijagnoza dermatitis herpetiformisa*

Dijagnoza se uspostavlja klinički, histološki, imunopatološki (izravna imunofluorescencija) i serološki (IgA protutijela na tkivnu transglutaminazu (anti-tTG) i IgA endomizijalna autoantitijela (EMA)) (Caproni i sur., 2009). Budući da se dermatitis herpetiformis smatra kožnom biopsijom, biopsijom kože potvrđena dijagnoza dermatitis herpetiformis koristi se kao indirektni dokaz za prisutnost oštećenja crijevne sluznice i stoga duodenalna biopsija nije potrebna (Sapone i sur., 2012).

### *2.2.3. Glutenska ataksija*

Glutenska ataksija definira se kao idiopatska sporadična ataksija u prisutnosti cirkulirajućih antiglijadinskih protutijela (IgA/IgG klase) (Hadjivassiliou i sur., 2008a). Odnosno, to je autoimuna bolest koju karakterizira oštećenje cerebeluma koje rezultira ataksijom (Sapone i sur., 2012). Međutim, patogeneza glutenske ataksije nije do kraja jasna (Hadjivassiliou i sur., 2008b), a u pacijenata s glutenskom ataksijom pronađena su protutijela na tkivnu transglutaminazu 6 (tTG6), transglutaminaza prvenstveno ekspresirana u mozgu (Hadjivassiliou i sur., 2006), te je pokazano kako pacijenti s glutenskom ataksijom imaju imunološki odgovor (IgG i IgA) primarno usmjeren na TG6, čak i u odsutnosti enteropatije (Hadjivassiliou i sur., 2008b).

Hadjivassiliou i sur. (2017), predstavili su dvadesetogodišnje iskustvo prospektivne evaluacije 1500 pacijenata s progresivnom ataksijom. Od 1500 pacijenata 20% imalo je obiteljsku povijest bolesti, a preostali su imali sporadičnu ataksiju. Pritom, najčešći uzrok sporadične ataksije bila je glutenska ataksija s 25%.

#### *2.2.3.1. Klinička slika glutenske ataksije*

Glutenska ataksija obično je prisutna kao izrazita cerebelarna ataksija ili, rjeđe, ataksija u kombinaciji s mioklonusom, palatalnim tremorom (Brucke i sur., 1988; Hadjivassiliou i sur., 2008a), opsoklonusom (Deconinck i sur., 2006) ili korejom (Pereira i sur., 2004). Obično ima podmucao napad, u prosječnoj dobi od 53 godine. Rijetko ataksija može biti vrlo progresivna, oponašajući paraneoplastičnu cerebralnu degeneraciju (Hadjivassiliou i sur., 2010). Vidljivi nistagmus i drugi očni znakovi cerebralne disfunkcije, vidljivi su u i do 80% slučajeva, a svi pacijenti imaju ataksiju hoda, a većina ataksiju ekstremiteta. Također, manje od 10% bolesnika s glutenskom ataksijom imat će gastrointestinalne simptome, ali trećina ima dokaze eneropatije putem biopsije. Do 60% pacijenata ima neurofiziološke dokaze senzomotorne aksonalne neuropatije, ovisno o duljini (Hadjivassiliou i sur., 2008a), a ova neuropatija je obično blaga i ne pridonosi ataksiji (Hadjivassiliou i sur., 2010).

#### *2.2.3.2. Dijagnoza glutenske ataksije*

Sadašnje su preporuke da bolesnike s progresivnom cerebelarnom ataksijom treba ispitati na glutensku preosjetljivost koristeći AGA IgA i IgG, anti-tTG2 protutijela i, ako je moguće IgG i IgA anti-tTG6, a kod bolesnika s pozitivnim anti-tTG2 treba učiniti i biopsiju sluznice tankog crijeva (Sapone i sur., 2012).

#### *2.2.4. Alergija na pšenicu*

Alergija na hranu je nepovoljni imunološki odgovor koji se ponovljivo pojavljuje nakon izlaganja danoj hrani (Walsh i O'Flynn, 2011). Gastrointestinalne alergije na hranu mogu uzrokovati različite kliničke manifestacije i ovisno o osnovnom mehanizmu, klasificirane su kao imunoglobulin E (IgE) – posredovane, ne – IgE – posredovane i miješane imunološke reakcije (Boyce i sur., 2010; Walsh i O'Flynn, 2011). Alergija na pšenicu

predstavlja IgE – posredovanu imunološku reakciju, a kada se alergen specifično veže za IgE antitijela, on potiče aktivaciju mastocita i bazofila (Balakireva i Zamyatnin, 2016).

Obično se razvija u djetinjstvu (Savage i Johns, 2015), a u kohortnoj studiji u Stockholmu uočena je prevalencija senzibilizacije na pšenicu od 4%, među 2336 četverogodišnje djece (Ostblom i sur., 2008a), te su isti autori uočili smanjenje zabilježenih reakcija na pšenicu od prve do osme godine starosti (Ostblom i sur., 2008b). Suprotni zaključak pokazala je longitudinalna studija na 273 djece, dobi dvije do deset godina, pokazujući kako se prevalencija IgE – posredovane reakcije na pšenicu progresivno povećava s dobi od 2% do 9% (Matricardi i sur., 2008). U odraslih osoba u SAD-u uočena je prevalencija od 0,4% (Vierk i sur., 2007), dok rezultati meta-analize koja je ispitivala prevalenciju alergije na hranu u Europi, pokazuju kako je samoprocijenjena prevalencija alergije na pšenicu 3,6%, a dokazana prevalencija je 0,1%. (Nwaru i sur., 2014).

#### 2.2.4.1. Oblici alergije na pšenicu i simptomi

Ovisno o putu izloženosti alergenu i imunološkim mehanizmima u podlozi, alergija na pšenicu dijeli se na klasičnu alergiju na hranu koja zahvaća kožu, probavni trakt ili respiratorni trakt; vježbanjem induciranu, o pšenici ovisnu anafilaksiju; pekarsku astmu i rinitis; te kontaktnu urtikariju (Sapone i sur., 2012).

Većina djece alergične na pšenicu istodobno pati od umjerenog do teškog atopijskog dermatitisa i osjetljivosti na druge namirnice kao što su mlijeko i jaja (Inomata, 2009). U djece ingestija glutena izaziva *tipične IgE posredovane reakcije brzog početka*, kao što su urtikarija, angioedem, bronhalna opstrukcija, mučnina i bol u truhu ili u nekim slučajevima i anafilaksiju. U kasne manifestacije, koje se javljaju nakon oko 24 sata od ingestije, ubrajaju se probavni simptomi i egzacerbacija atopijskog dermatitisa (Mišak, 2014). U odraslih alergija na hranu nakon ingestije pšenice je rijetka, a najčešća varijanta kod odraslih osoba je *vježbanjem inducirana, o pšenici ovisna anafilaksija*, gdje simptomi proizlaze iz kombinacije uzročnika, unosa hrane i tjelesne aktivnosti (Palosuo, 2003). Pacijenti s ovim tipom alergije pokazuju široki raspon kliničkih simptoma, od generalizirane urtikarije, dispneje, gastrointestinalnih simptoma do teške anafilaksije kada izvode tjelesnu aktivnost unutar tri do četiri sata od konzumacije pšenice. U nekim slučajevima simptomi se mogu pojaviti kada se pšenica konzumira odmah nakon vježbanja (Elli i sur., 2017). Najvažniji protein zrna povezan s vježbanjem induciranom, o pšenici ovisnoj anafilaksiji je  $\omega_5$ -glijadin (Morita i sur., 2003), dok se ostale alergijske reakcije nakon ingestije pšenice povezuju s nizom proteina pšenice

(Sapone i sur., 2012). *Pekarska astma i rinitis* alergijski su odgovor na inhalaciju pšeničnog i drugog brašna i prašine (Tatham i Shewry, 2008). Pekarska astma je jedna od najčešćih profesionalnih alergija u mnogim zemljama (Sapone i sur., 2012). Pacijenti s pekarskom astmom nikad nemaju problema s ingestijom kuhane pšenice (Inomata, 2009), ali neki od njih mogu razviti druge simptome koji nisu respiratorni, nakon ingestije obroka koji su kontaminirani sirovim pšeničnim brašnom ili ne posve kuhane hrane na bazi pšenice (Salvatori i sur., 2008). *Kontaktna urtikarija* je reakcija osjetljivosti koja se pojavljuje na koži, nakon dodira sa tvari koja ju izaziva, a u većini slučajeva vezana je uz zanimanje oboljele osobe (mlinari, pekari i rukovatelji hranom), a najčešće zahvaćena mjesta na tijelu jesu dlanovi, ruke i lice (Scherf i sur., 2016). Simptomi uključuju pruritis, lokalizirane reakcije na koži, često popraćene angioedemom, generaliziranom urtikarijom i anafilaksijom (Scherf i sur., 2016).

#### 2.2.4.2. Dijagnoza alergije na pšenicu

Dijagnoza alergije na pšenicu klasično se temelji na kliničkoj slici, kožnim ubodnim testovima, in vitro specifičnim IgE testovima te funkcionalnim testovima (Elli i sur., 2017). Ipak, funkcionalni testovi se smatraju zlatnim standardom za dijagnoze, ali popraćeni su rizikom od ozbiljnih induciranih reakcija i nepraktični su (Cianferoni, 2016). Oni obuhvaćaju bronhoprovokacijski test kod pekarske astme i dvostruko slijepi placebom kontrolirani test opterećenja hranom te otvoreni oralni test opterećenja kod klasične alergije na hranu (Cianferoni, 2016; Wang, 2010).

#### 2.2.5. Preosjetljivost na gluten

Preosjetljivost na gluten je pojam koji se koristi za opisivanje kliničkog stanja u kojem se intestinalni i ekstraintestinalni simptomi povezani s ingestijom glutena, koji se poboljšavaju ili nestaju u roku nekoliko sati ili nekoliko dana nakon izbjegavanja glutena, a u kojem su celijakija i alergija na pšenicu potpuno isključeni (Valenti i sur., 2017). Potrebno je napomenuti kako su neke studije predložile kako pored glutena, pšenični amilaza – tripsin inhibitori (Junker i sur., 2012) i fermentabilni, slabo apsorbirani, ugljikohidrati kratkog lanca (eng. FODMAP; fermentabilni oligo-, di-, i monosaharidi i polioli) mogu pridonijeti simptomima preosjetljivosti na gluten (Biesiekierski i sur., 2013). Za razliku od celijakije, preosjetljivost na gluten nije korelirala s HLA – DQ2 i - DQ8, jer su ovi genetski markeri pozitivni u samo u 46% pacijenata s preosjetljivošću na gluten, što je samo nešto više od

opće populacije (30%) (Volta i sur., 2012). Iako je etiologija nepoznata, Sapone i sur. (2011) uočili su kako preosjetljivost na gluten uključuje mehanizam urođene imunosti, bez ikakvog uplitanja stečenog imunološkog odgovora.

Prevalencija preosjetljivosti na gluten u općoj populaciji još je nepoznata, a čini se da je veća nego kod celijakije, te se procjenjuje da iznosi oko 6% (Scherf i sur., 2016), a navodi se i da se kreće u rasponu od 0,63%-6% (Volta i sur., 2013). Preosjetljivost na gluten uglavnom je opisana u odraslih osoba, osobito žena u dobi od 30 do 50 godina (Catassi, 2015).

#### *2.2.5.1. Klinička slika preosjetljivosti na gluten*

Vremenski interval između ingestije i pojave simptoma kod preosjetljivosti mogu varirati od nekoliko sati do nekoliko dana (Sapone i sur., 2012; Volta i sur., 2013). Sluznica tankog crijeva u pacijenata s preosjetljivošću na gluten obično je normalna, a serumska anti-TG2 protutijela, protutijela anti-deamidiranih glijadinskih peptida, kao i IgE protutijela pšenice su negativna (Volta i sur., 2012). Poremećaj karakteriziraju bolovi u truhu, nadutost, konstipacija ili dijareja i gubitak tjelesne mase. Odnosno, tipična prezentacija preosjetljivosti na gluten predstavlja kombinaciju simptoma sličnih simptomima sindroma iritabilnog crijeva (Elli i sur., 2017). Pacijenti također mogu imati ekstraintestinalne simptome koji uključuju glavobolju i migrenu, kronični umor, bolove u mišićima i zglobovima, utrnucé nogu ili ruku, manifestacije na koži poput svrbeža i dermatitisa, anksioznost i depresiju (Czaja – Balsa, 2015; Volta i sur, 2013; Volta i sur., 2014). Neki autori povezuju preosjetljivost na gluten sa shizofrenijom, poremećajima iz spektra autizma i depresije (Lionetti i sur., 2015b; Batista i sur., 2012). Nadalje, klinička povijest simptoma malapsorpcije, nedostatka hranjivih tvari i autoimunih komorbiditeta, opisana je rjeđe u ispitanika s preosjetljivošću na gluten, nego u pacijenata s celijakijom (Kabbani i sur., 2014).

#### *2.2.5.2. Dijagnoza preosjetljivosti na gluten*

Trenutno, dijagnoza preosjetljivosti na gluten postavlja se isključenjem celijakije i alergije na pšenicu, pod uvjetom negativnih seroloških testova za celijakiju, negativnih histoloških nalaza i negativnih testiranja na IgE (Lotta i sur., 2016). Neki stručnjaci strogo preporučuju provođenje duodenalne biopsije kako bi isključila mogućnost „tihe“ celijakije (Volta i Villanacci, 2011), a u kliničkoj praksi pacijenti često traže medicinsku procjenu kad već izbjegavaju gluten (Elli i sur., 2017). HLA tipizacija može isključiti celijakiju kada je bezglutenska prehrana u tijeku, u slučaju izostanka HLA DQ2/DQ8. Ako genetsko ispitivanje

nije dostupno ili je neuvjerljivo, potrebno je planirati opterećenje s glutenom (Elli i sur., 2017).

## **2.3. BEZGLUTENSKA PREHRANA**

### 2.3.1. Informiranje potrošača o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani

Prema Uredbi (EU) br. 828/2014 kada se za pružanje informacija potrošačima o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani upotrebljavaju izjave, te informacije daju se putem izjava i u skladu s uvjetima utvrđenima u Prilogu.

#### *2.3.1.1. Opći uvjeti*

Kada je sadržaj glutena u hrani kao gotovom proizvodu manji od  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ , tada je dopušteno na proizvodu navesti izjavu „bez glutena“. Ukoliko se proizvod sastoji ili sadržava jedan ili više sastojaka proizvedenih od pšenice, raži, ječma i zobi ili njihovih hibridnih vrsti, koji su posebno prerađeni s ciljem smanjenja količine glutena, a ne sadržava količinu glutena višu od  $100 \text{ mgkg}^{-1}$  u gotovom proizvodu, tada je dopušteno navesti izjavu „vrlo mali sadržaj glutena“.

#### *2.3.1.2. Dodatni zahtjevi za hranu koja sadržava zob*

Zob koju sadržava hrana koja se prezentira kao hrana bez glutena ili s vrlo malim sadržajem glutena mora se proizvoditi, priređivati i/ili prerađivati na način kojim se sprječava kontaminacija pšenicom, raži, ječmom ili njihovim hibridnim vrstama, a količina glutena u takvoj zobi ne smije biti viša od  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ .

### 2.3.2. Bezglutenska prehrana

Bezglutenska prehrana je jedini način liječenja u pacijenata s celijakijom i ostalim poremećajima povezanim s glutenom (Rostami i sur., 2017), te je i jedini lijek za celijakiju utvrđen do danas striktna i doživotna bezglutenska prehrana (Schumann i sur., 2017). Ona je karakterizirana kombinacijom prirodno bezglutenskih namirnica s bezglutenskim zamjenskim namirnicama na bazi žitarica (Pellegrini i Agostoni, 2015). Oboljeli bi pritom trebali iz svoje prehrane izostaviti hranu koja sadrži pšenicu, raž i ječam (Howdle, 2003), a toksičnost zobi i dalje ostaje kontroverzna (Woodward, 2015). Razne namirnice prirodno ne sadržavaju gluten

(riža, krumpir, kukuruz, meso, riba, voće i povrće), a postoje i dijetetski proizvodi bez glutena namijenjeni bolesnicima s celijakijom označeni napomenom „bez glutena“ i/ili simbolom prekriženog klasa pšenice (brašno, tjestenine, kruh, kolači, slatkiši) (Čuković-Čavka i sur., 2013) (Slika 2.). Također, bezglutensko brašno dostupno je i na liječnički recept (Barbarić, 2008), a na hrvatskom tržištu prisutno je nekoliko vrsta bezglutenskog brašna koji se sastoje od različitih vrsta škroba. Neka od njih sastoje se od pšeničnog škroba gdje je gluten uklonjen, ili od prirodno bezglutenskog škroba, kao što su kukuruzni, krumpirov ili tapiokin škrob (Šubarić i sur., 2012; Witczak i sur., 2016). Valja naglasiti da ukoliko bezglutenski proizvodi sadržavaju pšenični škrob u kojem je gluten uklonjen, tada takvi proizvodi nisu prikladni za osobe koje imaju alergiju na pšenicu (BDA, 2017). Međutim, s vremenom je došlo do velikog poboljšanja u dostupnosti hrane proizvedene upotrebom bezglutenskog brašna, a pacijenti mogu kupiti bezglutenske zamjene za skoro svako jelo koje sadrži gluten, uključujući pizzu, perece, paštu, pa čak i pivo (See i sur., 2006). No, pacijenti bi također trebali biti informirani o višim cijenama takvih proizvoda (Kulai i Rashid, 2014), jer visoki troškovi utječu na one slabijeg socioekonomskog statusa (Burden i sur., 2015).



Slika 2. Simbol prekriženog klasa pšenice (Anonymous 2)

Bezglutenska prehrana uključuje ograničenja koja mogu biti teška za prihvatiti i slijediti (Bascunan i sur., 2016), a istraživanje provedeno u Hrvatskoj pokazalo je da gotovo 27% bolesnika (srednje dobi 12 godina; prosječno 9 od postavljanja dijagnoze celijakije) uzima male količine glutena dok se 14% oboljelih uopće ne pridržava bezglutenske prehrane (Jadrešin i sur., 2008). Međutim, provođenjem stroge bezglutenske prehrane simptomi bolesti povezanih s glutenom će se ublažiti ili čak nestati, a u osoba s celijakijom s vremenom će doći do oporavljanja sluznice tankog crijeva. Stanje organizma se može toliko oporaviti da bude kao u svake zdrave osobe (Fasano i Catassi, 2001). Kod glutenske ataksije važno je

napomenuti da odgovor na bezglutensku prehranu ovisi o duljini trajanja ataksije prije postavljanja dijagnoze i stoga je važno što ranije započeti liječenje (Sapone i sur., 2012). To je jedna od fundamentalnih razlika između celijakije, dermatitisa herpetiformisa i glutenske ataksije, gdje crijevo i koža imaju potencijala za regeneraciju, dok neuralno tkivo nema (Hadjivassiliou i sur., 2008b). S druge strane, pacijenti s alergijom na pšenicu obično ne moraju ograničiti ostale žitarice koje sadrže prolamine, kao što su raž, ječam i zob. Dakle, prehrana bez pšenice može biti liberalnija od stroge bezglutenske prehrane (Pietzak, 2012), a isključivanje svih žitarica iz prehrane osoba s alergijom na pšenicu se ne preporuča i može imati nutritivne, razvojne i psihosocijalne posljedice (Wang, 2010). Ipak, neke osobe mogu podnositi gluten do određene granice u promjenjivim malim količinama (Uredba (EU) br.828/2014). Catassi i sur. (2007), navode kako je točan udio glutena, koji osobe oboljele od celijakije mogu tolerirati bez razvoja štetnih učinaka, teško za procijeniti. Udio vjerojatno varira među pojedincima, ali unos manji od 10 mg glutena na dan smatra se sigurnim, dok prolongirani unos od 50 mg glutena na dan pokazalo se da uzrokuje značajno oštećenje građe tankog crijeva, u liječenih osoba (Catassi i sur., 2007).

#### *2.3.2.1. Nutritivna vrijednost bezglutenskih proizvoda*

Posljednjih godina interes za bezglutenskom prehranom znatno se povećao (Bascunan i sur., 2016). Dok se pacijenti koji pate od bolesti povezanih s glutenom oslanjaju na bezglutensku prehranu, ostali konzumenti odabiru ju slijediti kao životni stil (Worosz i Wilson, 2012), te ju neki pojedinci smatraju kao zdravijim izborom (Bascunan i sur., 2016). Bezglutenska prehrana ne preporuča se općoj populaciji i nema dokaza da je blagotvorna u pojedinaca bez simptoma i onih koji nemaju celijakiju. Umjesto toga, prisutna je zabrinutost koja se odnosi na njenu prehrambenu vrijednost (Rostami i sur., 2017). Postoji vrlo dugački popis žitarica, sjemenki, mahunarki i orašastih plodova koji, između ostalog, prirodno ne sadrže gluten (poput amaranta, kvinoje, prosa, lana, slanutka, itd.) te koji mogu poboljšati okus i nutritivnu kvalitetu bezglutenske prehrane, ali se manje koriste dijelom zbog visoke cijene (Kupper, 2005). Umjesto toga, bezglutenski proizvodi obično sadrže ograničen broj sastojaka i nisu obogaćeni mikronutrijentima (do Nascimento i sur., 2013). Godine 1999. i 2000. Thompson izazvala je zabrinutost o sadržaju mikronutijenata u bezglutenskim proizvodima. U svojim radovima pokazala je kako bezglutenske žitarice, i zamjenski proizvodi napravljeni od njih, ne sadrže toliko željeza, vlakana, folata, tiamina, riboflavina i niacina u usporedbi s njihovim ekvivalentima koji sadrže gluten, što zauzvrat može utjecati na



nutritivnu adekvatnost bezglutenske prehrane. Nadalje, Hallert i sur. (2002), izvijestili su o znakovima nedostatka vitamina u pacijenata s celijakijom koji su se pridržavali bezglutenske prehrane, dok su Bituh i sur. (2011), pokazali kako su pacijenti s celijakijom uključeni u studiju, a koji su se držali bezglutenske prehrane, imali neadekvatan unos folata i nizak status folata i vitamina B<sub>12</sub>, što je bilo u korelaciji s blago povišenim koncentracijama homocisteina. Neki autori ukazuju na odnos između neravnoteže u metabolizmu homocisteina i patogeneze bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, neurološki i psihijatrijski poremećaji, kronična bolest bubrega, oštećenja koštanog tkiva, gastrointestinalnih poremećaja, raka i kongenitalnih defekata (Škovierova i sur., 2016). Osim toga, Saturni i sur. (2010), izvjestili su kako bezglutenska prehrana ne može jamčiti adekvatan nutritivni unos i kako 20-38% pacijenata s celijakijom doživljava nutritivne nedostatke koji uključuju bjelančevine, prehrambena vlakna, mineralne tvari i vitamine. S obzirom da jedino liječenje celijakije predstavlja prehrana bez glutena, takvi podaci izazivaju zabrinutost zbog dugoročnog zdravlja pojedinaca (Lee i sur., 2009). Zato bi bezglutenski proizvodi trebali biti, ne samo bez glutena, već moraju biti usporedivi prema nutritivnom profilu s proizvodima koji sadrže gluten (Jnawali i sur., 2016). Prema tome, naglasak bi trebao biti stavljen na odabir prirodno bezglutenske hrane i izbjegavanju pretjeranog oslanjanja na procesiranu hranu bez glutena. Uočeno je kako procesirana hrana bez glutena ima tendenciju niskog udjela vlakana, vitamina i mineralnih tvari, visok udio šećera, masti i energije, a mnoge namirnice bez glutena napravljene su od rafiniranog brašna i/ili škroba koji zbog prerade imaju nizak udio vlakana (Theethira i Dennis, 2015).

#### *2.3.2.2. Uvrštavanje zobi u bezglutensku prehranu*

Janatuinen i sur. (1995) objavili su studiju o sigurnosti zobi u kojoj su otkrili kako upotreba zobi u osoba s celijakijom, kao dio bezglutenske prehrane, nije imala nepovoljne učinke na odrasle pacijente u remisiji i nije spriječila simptomatsko liječenje i liječenje sluznice u pacijenata kojima je tek dijagnosticirana bolest. Budući da nije bila poznata sigurnost dugotrajnog unosa zobi u osoba s celijakijom, Janatuinen i sur. (2002) nastavili su svoju prethodnu studiju od 6 do 12 mjeseci i proveli petogodišnju studiju. Objavili su rad u kojem potvrđuju kako uzimanje zobi ne dovodi do bilo kakvog oštećenje duodenalne sluznice u odraslih pacijenata s celijakijom. Zanimljivo je kako je u ovoj studiji duodenalna sluznica pokazala sporo, ali sigurno poboljšanje čak i nakon nekoliko godina na bezglutenskoj prehrani sa i bez zobi. Isto tako, u velikoj presječnoj studiji koju su

proveli Kaukinen i sur. (2013), uočeno je kako kod celijakije dulja konzumacija zobi, do osam godina, nije imala štetan učinak na simptome, morfologiju crijevnih resica tankog crijeva i upalu, kao ni humoralni odgovor na tkivnu transglutaminazu. Naprotiv, morfologija sluznice bila je čak znatno bolja kod osoba koje su konzumirale zob u većim količinama ili tijekom dužeg vremenskog perioda, nego kod onih koji nisu konzumirali zob. Među djecom s celijakijom, pokazalo se kako je dulja konzumacija zobi dobro tolerirana i nije rezultirala pogoršanjem sluznice tankog crijeva ili imunološkom aktivacijom (Holm i sur., 2006). Ipak, neki autori objavili su jasne dokaze koji sugeriraju kako avenin ima sposobnost potaknuti aktivaciju T-stanica sluznice, uzrokujući upalu crijeva i atrofiju crijevnih resica (Pulido i sur., 2009). Međutim, u Uredbi (EU) br. 828/2014 navodi se kako većina osoba intolerantnih na gluten može u svoju prehranu uključiti zob bez ikakvih štetnih posljedica po svoje zdravlje. Veći problem predstavlja kontaminacija zobi pšenicom, raži ili ječmom do koje može doći za vrijeme žetve, prijevoza, skladištenja i prerade. Stoga je potrebno voditi računa o opasnosti od kontaminacije glutenom proizvoda koji sadržavaju zob kada je riječ o odgovarajućim informacijama o tim prehrambenim proizvodima koje pružaju gospodarski subjekti u poslovanju s hranom. Dakle, stručnjaci koji rade s pacijentima oboljelima od celijakije bi trebali razmotriti naglašavanje važnosti kupnje certificirane bezglutenske zobi i proizvoda na bazi zobi (Rostami i sur., 2017).

Temeljem ključnih kliničkih ispitivanja u objavljenoj literaturi količina čiste zobi razmatrana unutar sigurnih granica je 50-70 g na dan za odrasle i 20-25 g na dan za djecu (Pulido i sur., 2009).

## **2.4. KONTAMINACIJA BEZGLUTENSKE HRANE**

Jednoglasno je mišljenje da bi prehrana bez glutena trebala biti striktna što je više moguće (Collin i sur., 2004). Međutim, osobe koje moraju provoditi bezglutensku prehranu, ponekad ju krše iz nekoliko razloga: zbog nedostatka smjernica o bolesti i pripremi hrane, zbog nevjerice glede zabranjenih proizvoda, financijskih poteškoća, dugogodišnjih navika konzumacije i pripremanja obroka s pšeničnim brašnom i nedostatka kuharskih vještina u pripremi hrane bez glutena (Karajeh i sur., 2005; George i sur., 2008; Araujo i Araujo, 2011). Kršenje bezglutenske prehrane može biti dobrovoljno ili nenamjerno. Dobrovoljno podrazumijeva da je pojedinac svjestan njegove konzumacije glutena i svejedno to radi, a nenamjerno je kad osoba ne zna da se u konzumiranoj hrani nalazi gluten (Araujo i Araujo, 2011; Oliveira i sur., 2014). Gluten nije samo univerzalni sastojak kruha, kolača i tjestenina,

nego često i skriveni sastojak industrijski pripremljenih juha, umaka, slatkiša i suhomesnatih proizvoda (Čuković-Čavka i sur., 2013). On se može i slučajno unijeti u hranu putem križne kontaminacije (Hassan i sur., 2017). Križna kontaminacija odnosi se na proces u kojem hrana dolazi u kontakt i inkorporira strane tvari koje mogu biti štetne za zdravlje, a u bezglutenskoj prehrani to podrazumijeva da hrana bez glutena zapravo sadrži gluten (Bascunan i sur., 2016). Pritom do kontaminacije može doći kod kuće ili izvan nje. Izvori kontaminacije u kući mogu biti tegle u kojima se na primjer nalaze džem, maslac od kikirikija, majoneza, zatim posuđe, daske za rezanje ili toster koji se dijele unutar obitelji (See i sur., 2006). Izvan kuće, bezglutenski proizvodi se mogu kontaminirati već na samom polju tijekom žetve, ali i tijekom mljevenja, transporta ili procesiranja žitarica pa žitarice koje su prirodno bez glutena, kao što su kukuruz, riža, heljda, kvinoja i amarant, mogu sadržavati gluten (Scherf i Poms, 2016). Do kontaminacije može doći i pri skladištenju, proizvodnji, pakiranju i distribuciji prehrambenih proizvoda (HOK, 2016). Glutenom mogu biti kontaminirani radni prostori, površine, uređaji, pribor i radna odjeća, a najčešće kritične točke su: skladištenje, klima uređaji i nape, pećnice i ostali kuhinjski uređaji, čistoća radnih površina, ruku i radne odjeće, solenke, boce s uljem, pribor za kuhanje (kuhače, daske za rezanje, cjedila, itd.), istovremeno kuhanje bezglutenskog i glutenskog obroka, posuđe za serviranje, te posluživanje (HOK, 2016). Unatoč korištenju kontrolirane bezglutenske mješavine brašna, kontaminacija može biti visoka kada proizvodni pogoni nisu pravilno očišćeni (Deutsch i sur., 2009). Stoga, za na primjer pekarnice preporučaju se odvojene prostorije za proizvodnju i odvojena oprema za proizvodnju (Deutsch i sur., 2009), budući da okolina u kojoj se proizvode pekarski proizvodi uključuje veliku manipulaciju pšeničnim brašnom, što povećava mogućnosti za križnu kontaminaciju (Farage i sur., 2017). Isto tako, kako bi se izbjegao bilo koji oblik kontaminacije, sastojci koji sadrže gluten trebaju biti smješteni i njima se treba koristiti na mjestima koja su strogo odvojena od onih bezglutenskih (Foschia i sur., 2016). Također, kontaminacija je moguća u trgovinama gdje su žitarice dostupne iz otvorenih posuda, na švedskim stolovima, na bilo kojem mjestu gdje se proizvode različiti obroci ili kada različiti sastojci dolaze zajedno (See i sur., 2006). Neke organizacije osoba s celijakijom potaknule su proizvođače hrane bez glutena na upotrebu oznaka kao što je, već spomenuti, simbol prekriženog zrna, a proizvođači zainteresirani za korištenje tih oznaka trebaju slijediti tehničke uvjete za licenciranje. To uključuje dobru proizvođačku praksu i HACCP (engl. *Hazard Analysis Critical Control Points* – Analiza opasnosti i kritične kontrolne točke), čime se osigurava izbjegavanje kontaminacije glutena tijekom svih faza proizvodnje, skladištenja, prijevoza i rukovanja (Bustamante i sur., 2017). HACCP je alat koji pomaže proizvođačima hrane prilikom

identifikacije, procjene i kontrole opasnosti koje mogu biti vezane za određeni proizvod ili cijelu proizvodnu liniju (HAH, 2017). Dakle, potrebno je posvetiti veliku pažnju odabiru namirnica, s obzirom da u raznim proizvodima gluten može biti prisutan u tragovima. Zbog toga preporučeno je da se pacijenti, koji pate od bolesti povezanih s glutenom, pridržavaju proizvoda koji su označeni kao bezglutenski, te ako su certificirani i analitički provjereni na regularnoj osnovi, na ostatke glutena (Thompson i Simpson, 2015). Proizvodnja sigurnih bezglutenskih proizvoda predstavlja složeni proces, ali sigurnost je esencijalna za poboljšanje kvalitete života osoba koje provode bezglutensku prehranu iz zdravstvenih razloga (Farage i sur., 2016). Iako su bezglutenski proizvodi dostupni, skriveni izvori glutena i kontaminacija glutenom mogu ograničiti način života osoba s celijakijom i mogu utjecati na njihovu kvalitetu života (Lee i sur., 2003). Izlaganje glutenu putem kontaminacije, kod na primjer osoba oboljelih od celijakije, može dovesti do daljnje aktivnosti bolesti (Welstead, 2015), jer se time može spriječiti histološki i klinički oporavak (Hollon i sur., 2013). Iako je najsigurnije za pacijenta da konzumira hranu kod kuće, ponekad je neophodno jesti izvan nje. Dok osobe koje provode bezglutensku prehranu mogu kod kuće u visokom stupnju kontrolirati pripremu hrane (See i sur., 2006), konzumiranje hrane izvan kuće i putovanja pokazala su se problematična za osobe oboljele od celijakije (Lee i sur., 2003). U studiji koju su proveli Karajeh i sur. (2005), kada su upitali ispitanike oboljele od celijakije jesu li skeptični oko konzumiranja hrane koja nije pripremljena kod kuće, 82,1% ispitanika bilo je skeptično oko konzumiranja hrane za van (engl. „take away food“), 78,6% bilo je skeptično oko konzumiranja hrane u restoranima, a 61,3% ispitanika bilo je skeptično oko konzumiranja hrane kod prijatelja. Nadalje, u studiji provedenoj na Novom Zelandu, među 936 osoba oboljelih od celijakije, u dobi od 16 i više godina, više od jedne trećine (36,3%) izbjegavalo je putovanja zbog bolesti barem neko vrijeme, a jedna četvrtina (25,6%) je odgovorila kako nikada ili rijetko jedu u restoranima zbog opasnosti od nenamjernog unosa glutena (Sharp i sur., 2014). Unatoč bezglutenskom jelovniku, mnogi restorani ne slijede stroge smjernice kako bi se izbjegla kontaminacija, koja se na primjer može dogoditi kada se meso priprema na kontaminiranom roštilju ili kada se posuđe za posluživanje koristi i za bezglutensku hranu i onu koja sadrži gluten (See i sur., 2006). Na sreću, kuhari su postali svjesniji bezglutenske prehrane i zabrinutosti zbog kontaminacije tijekom proteklog desetljeća (Aziz i sur., 2014). Unatoč tome, zbog problema kontaminacije preporuka je da osobe koje izbjegavaju gluten budu pažljive pri konzumiranju hrane izvan kuće (Schultz i sur., 2017), ali se javlja i potreba za određivanjem glutena u bezglutenskim proizvodima (Bascunan i sur., 2016).

## 2.5. METODA ODREĐIVANJA GLUTENA

U analitici namirnica koriste se brojni analitički postupci. Dobiveni podaci mogu se koristiti u različite svrhe, od temeljnih znanstvenih istraživanja, pa do potreba monitoringa, o čemu također ovisi odabir metode analize (Runje i Cvrtila, 2006). Određivanje glutena u zagrijavanim ili ekstrudiranim proizvodima poput kruha i tjestenine (Mena i sur., 2012) i proizvoda koji sadrže djelomično hidrolizirani gluten (Tanner i sur., 2013) je osobito izazovna. Kao prvi korak, ekstrakcija proteina glutena i/ili peptida iz matriksa hrane trebala bi biti što potpunija (Scherf i Poms, 2016). Većina metoda temelji se na kvantifikaciji frakcije prolamina glutena topljivih u alkoholu. Frakcija glutenina, prolamina netopljivih u alkoholu, često nije ciljana, iako i prolamini topljivi u alkoholu i glutenini sadrže imunogene peptide (Tye –Din i sur., 2010). Isto tako, budući da se uzima kako je sadržaj prolamina, topljivih u alkoholu, u glutenu 50% (Codex Alimentarius, 1979 rev. 2008), utvrđeni sadržaj prolamina topljivih u alkohol se obično množi s faktorom 2 kako bi se dobio sadržaj glutena. To se zasniva na pretpostavci da je omjer prolamina topljivih u alkoholu/prolamina netopljivih u alkoholu jednak 1 (Wieser i Koehler, 2009). Također, testovi obično uspoređuju dobivene analitičke signale sa baždarnom krivuljom, koja se generira skupom kalibratora različitih koncentracija ciljne molekule (Scherf i Poms, 2016).

Prema Codex Alimentariusu (1979 rev. 2008) kvantitativno određivanje glutena u hrani i sastojcima mora se temeljiti na imunološkoj metodi ili nekoj drugoj metodi koja osigurava barem jednaku osjetljivost i specifičnost. Zahtjevi za pouzdane analitičke metode, za kvantifikaciju glutena u hrani osim dostatne osjetljivosti i specifičnosti, su ponovljivost, robusnost i validacija kolaborativnim studijama s nekoliko neovisnih laboratorija (Koehler i sur., 2013a, 2013b; Don i Koehler, 2014). Za određivanje glutena dostupno je tako nekoliko tehnika, uključujući PCR, masenu spektrometriju i imunokemijske metode, posebno enzimski vezani imunosorbentni test (engl. *Enzyme – Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)) (Sajic i sur., 2017, Scherf i Poms, 2016). Prema Codex Alimentariusu (1979 rev. 2008) ELISA R5 metoda po Mendezu smatra se glavnom metodom za određivanje glutena u hrani.

### 2.5.1. ELISA metoda

ELISA je imunoenzimski test kojim se određuje prisutnost i količina antigena, te je njime moguće odrediti vrlo nisku koncentraciju analita od primjerice nekoliko ng po kg ispitivanog uzorka (Butorac i sur., 2013). Imuno testovi koriste specifično protutijelo

(imunoglobulin) za detektiranje antigena, odnosno tvari koja se određuje, na primjer proteini glutena ili peptidi. Protutijela se proizvode imunizacijom sisavaca kao što su miševi, kunići ili koze, nakon injekcije antigena. Pritom, monoklonska protutijela reagiraju s jednim, a poliklonska s više epitopa na molekuli antigena (Scherf i Poms, 2016). Uvođenju ELISA testa u istraživanja prethodilo je otkriće da se topljivi antigen ili protutijelo mogu vezati za čvrstu podlogu tako da se ne isperu puferiranom fiziološkom otopinom. U tu se svrhu rabe polistirenske mikrotitracijske pločice četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica. U testu su antigen ili protutijela označeni nekim enzimom, najčešće peroksidazom. Reakcija se očitava prema promjeni boje supstrata što ga enzim razgrađuje te je moguće očitavanje golim okom ili mjerenjem apsorbancije spektrofotometrom čime se postižu točniji rezultati (Runje i Cvrtila, 2006). Do sada je razvijeno nekoliko gluten- ili glijadin-specifičnih protutijela (Wieser, 2008), no većina komercijalno dostupnih ELISA testova za određivanje glutena temelje se na Skerritt (401,21) (Skerritt i Hill, 1990), R5 (Valdes i sur., 2003), G12 (Moron i sur., 2008) i  $\alpha$ 20 (Mitea i sur., 2008) monoklonskim protutijelima, ili različitim poliklonskim protutijelima (Scherf i Poms, 2016).

Kod ELISA R5 metode po Mendezu, protutijelo R5 usmjereno je protiv sekalina i detektira pentapeptide QPFP prisutne u glijadinima, sekalinima i hordeinim (Valdes i sur., 2003). Pritom za analizu glutena mogu se primijeniti dva načela, „sendvič“ ELISA i konkurentna ELISA (Wieser i sur., 2014), slikovito prikazano na Slici 3.

Kod „sendvič“ ELISA testa ploča (s jažicama) obložena je poznatom količinom protutijela „za hvatanje“, a nespecifična vezna mjesta na površini su blokirana. Zatim, nanošenjem uzorka koji sadrži antigen, formira se kompleks antigen/protutijelo (korak 1). Nakon uklanjanja viška uzorka ispiranjem, dodaje se detekcijsko protutijelo obilježeno s indikatorskim enzimom i veže se na drugo vezno mjesto antigena. Antigen se tako nalazi u „sendviču“ između protutijela „za hvatanje“ i detekcijskog protutijela (korak 2). Nevezano detekcijsko protutijelo se ispiri, a zatim se dodaje enzimski supstrat koji se transformira u obojeni produkt čija se apsorbancija može mjeriti na čitaču (korak 3). Izmjerena apsorbancija izravno je proporcionalna koncentraciji antigena u ekstraktu uzorka, koja se može izračunati iz baždarne krivulje (Scherf i Poms, 2016). Ova tehnika se može koristiti u kombinaciji s „cocktail“ otopinom za ekstrakciju, koja je korisna za ekstrakciju glutena čak i u toplinski obrađenoj hrani (Valdes i sur., 2003). „Cocktail“ otopina sadrži redukcijsko sredstvo, koje zajedno s alkoholnom ekstrakcijom, ekstrahira i monomerne i polimerne proteine glutena (Garcia i sur., 2005). Međutim, nedostatak „sendvič“ ELISA testa koji se temelji na R5 protutijelu jest da se može koristiti samo za određivanje ne-hidroliziranog glutena, jer

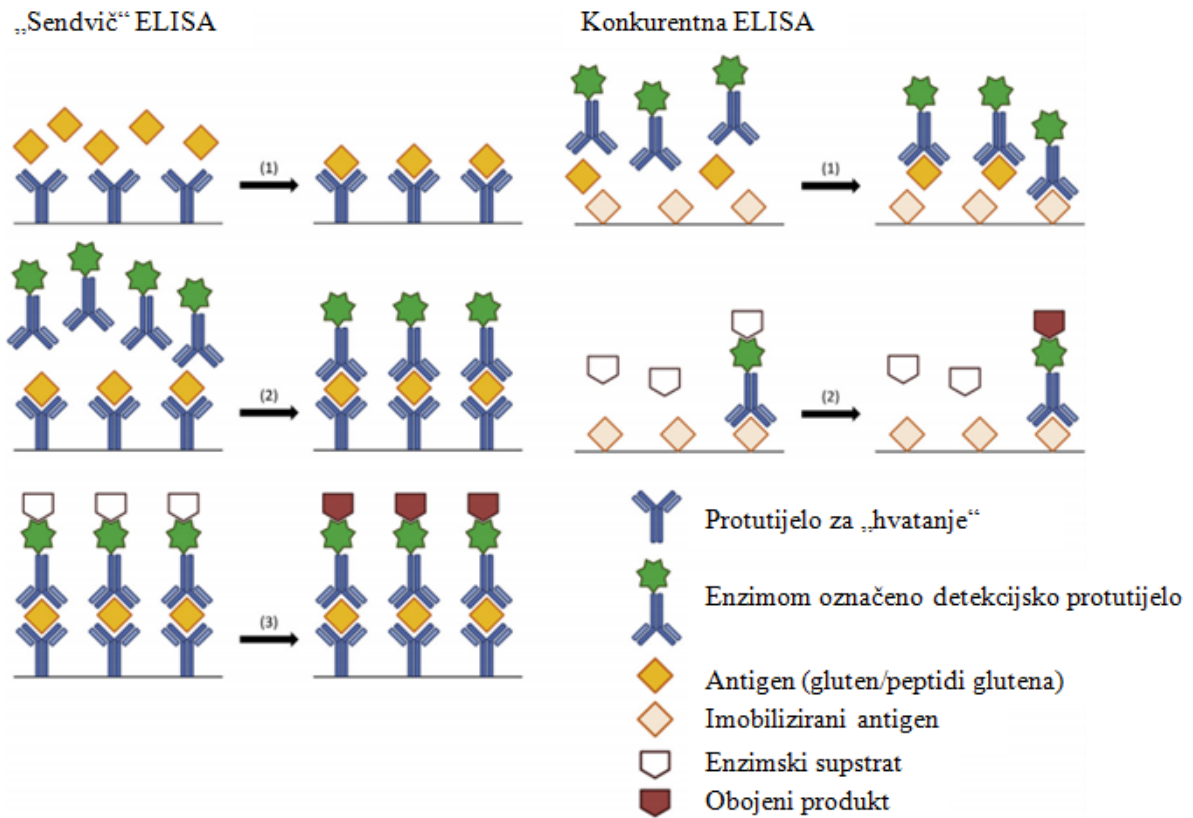
zahtijeva prisutnost najmanje dva epitopa u proteinu ili peptidu. Ako procesiranje hrane dovodi do stvaranja manjih fragmenata glijadina koji sadrže samo jedan epitop, kvantifikacija više nije točna (Mena i sur., 2012). Ovaj uvjet čini ju neprikladnom za analizu glutena u proizvodima koji sadrže djelomično hidroliziran gluten, kao što su pivo, proizvodi od kiselog tijesta ili ekstrakt slada, jer ovi peptidi glutena mogu imati samo jedno mjesto vezanja (Scherf i Poms, 2016).

Konkurentna ELISA može se koristiti i za intaktne proteine kao i za manje antigene (peptide glutena), jer zahtijeva samo jedno mjesto vezanja. Poznata količina antigena imobilizirana je na površini mikrotitarske ploče. Uzorak koji sadrži antigen i ograničena, konstantna količina, enzimom obilježenog, protutijela dodaju se istovremeno u jažicu. Tijekom inkubacije, imobilizirani i slobodni antigeni natječu se za mjesto vezanja na protutijelu (korak 1). Ako je u uzorku prisutno više antigena, manje će protutijela biti vezano za imobilizirane antigene. Nevezana protutijela, antigeni i kompleksi antigen/protutijelo uklanjaju se ispiranjem. Nakon dodavanja enzimskog supstrata, stvara se proizvod u boji (korak 2). U ovom slučaju, izmjerena apsorpcija je obrnuto proporcionalna koncentraciji antigena u ekstraktu uzorka. Ponovno, za izračunavanje koncentracije antigena u ekstraktu uzorka koristi se baždarna krivulja sa peptidom glutena ili peptidnom smjesom (Scherf i Poms, 2016). Konkurentna ELISA je jeftinija i brža od „sendvič“ načela, s obzirom da se koristi samo jedno protutijelo i inkubacija uzorka i konjugiranog protutijela provodi se zajedno (Mena i sur., 2012).

Općenito, ELISA testovi nude brze rezultate, ne zahtijevaju sofisticiranu laboratorijsku opremu, njima se lako rukuje, prikladni su za rutinske analize i često jeftiniji od ostalih tehnika, a ističe se i ponovljivost i osjetljivost. Unatoč tim prednostima, postoje i neki nedostaci. Pritom se komercijalno dostupni setovi ELISA testova razlikuju u mnogim aspektima, što može utjecati na rezultate. Ti aspekti uključuju princip ELISA testa („sendvič“ u usporedbi s konkurentnom), svojstva protutijela, njihove afinitete prema različitim žitaricama i glutenskim frakcijama, svojstva kalibracijskih standarda i činjenicu kako većina protutijela detektira samo prolamine topljive u alkoholu, tako da se sadržaj glutena izračunava dupliciranjem sadržaja prolamina topljivih u alkoholu (Scherf i Poms, 2016; Diaz – Amigo i Popping, 2013).

Za detektiranje kod zobi, prikladnost ELISA test ovisi o regulatornom okviru. U Europskoj Uniji, Australiji i Novom Zelandu, gdje je zob navedena kao izvor glutena, potreban je sekundarni test, jer većina monoklonskih protutijela (Skerrit, R5,  $\alpha$ 20) i Morinaga poliklonsko protutijelo ne prepoznaju zob (Scherf i Poms, 2016; Londono i sur., 2013).

Međutim, u Sjedinjenim Američkim državama, gdje se zob ne smatra izvorom glutena, testovi za određivanje kontaminacije zobi temeljeni na ovim monoklonskim protutijelima ili poliklonskom protutijelu bili bi prikladni, ali G12 monoklonsko protutijelo bi bilo neprikladno zbog svoje ograničene križne reaktivnosti sa zobi (Comino i sur., 2011).



Slika 3. „Sendvič“ ELISA (lijevo) i konkurentna ELISA (desno) (Scherf i Poms, 2016)



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja analizirano je dvadeset sedam uzoraka (Tablica 2) podijeljenih u skupine slastica, složenih jela i pekarskih proizvoda. Bezglutenski proizvodi prikupljeni su iz različitih ugostiteljskih objekata (slastičarnice, prodavaonice brze hrane, restorani) i prodavaonica u kojima se prodaju bezglutenski proizvodi hrvatskog podrijetla. Uvjeti za prikupljanje uzoraka bili su da su proizvodi ili vidljivo navedeni kao bezglutenski, ili su prema sastavu prirodno bezglutenski, ili je od strane kuhara/ica ili poslužitelja/ica usmeno rečeno da su proizvodi bezglutenski. Uzorci su homogenizirani uz pomoć mlinca, a zatim je u njima, uz pomoć ELISA metode, određen udio glutena.

Tablica 2. Uzorci u kojima su ELISA metodom određeni udjeli glutena

<b>Uzorci</b>	
<b>Slastice</b>	
Uzorak 1	kolač od đumbira i mrkve
Uzorak 2	kolač krempita
Uzorak 3	kolač od borovnice
Uzorak 4	kolač od limuna i badema
Uzorak 5	kolač od orašastih plodova
Uzorak 6	kolač od vanilije i marelice
Uzorak 7	muffin s vanilijom
Uzorak 8	kolač od badema i naranče
Uzorak 9	keksi od indijskih oraščića
Uzorak 10	keksi od heljde
Uzorak 11	keksi od oraha
Uzorak 12	keksi od vanilije
Uzorak 13	Palačinka
Uzorak 14	Palačinka
Uzorak 15	Sladoled

<b>Složena jela</b>	
Uzorak 16	pizza capricciosa
Uzorak 17	falafel sa salatam
Uzorak 18	toast sendvič od šunke i sira
Uzorak 19	sendvič u bezglutenskoj lepinji s pljeskavicom od kvinoje, vučjeg boba i slanutka
Uzorak 20	zlevka s bučom
Uzorak 21	prženi krumpirići

#### **Pekarski proizvodi**

Uzorak 22	bijeli kruh
Uzorak 23	Baguette
Uzorak 24	pecivo sa sjemenkama
Uzorak 25	bijelo pecivo
Uzorak 26	kruh sa sjemenkama
Uzorak 27	kruh sa sjemenkama

#### 3.1.2. Upitnik

U svrhu prikupljanja podataka o znanju o glutenu, bezglutenskoj prehrani, te načinu rukovanja i pripreme bezglutenskih proizvoda, proveden je upitnik među kuharima/icama i poslužiteljima/icama u ugostiteljskim objektima, koji u svojoj ponudi imaju bezglutenske proizvode. Upitnik je sastavljen od 17 pitanja, kombinacijom pitanja posebno osmišljenih za ovo istraživanje, te pitanja koja su Simpson i sur. (2011) i Schultz i sur. (2017) koristili u svojim istraživanjima. Na samom početku upitnika nalaze se osnovna pitanja o dobi i spolu ispitanika, u kojoj vrsti ugostiteljskog objekta rade te na koji način sudjeluju u pripremi bezglutenskih proizvoda. Nadalje, postavljena su pitanja kako bi se saznalo koliko ispitanika je čulo za celijakiju, a koliko za bezglutensku prehranu. Zatim, vrlo bitna pitanja postavljena u upitniku su ona o tome jesu li ispitanici prošli edukaciju o pripremi i posluživanju bezglutenske hrane, postoji li u njihovoj kuhinji HACCP protokol za pripremu bezglutenskih proizvoda i koriste li se prilikom pripreme i posluživanja bezglutenskih proizvoda drugim prostorijama, posuđem, priborom i posebnim policama od onih koji se koriste za namirnice koje sadrže gluten. Osim toga, postavljena su pitanja kako bi se provjerilo znanje ispitanika o

tome što je gluten, u kojim se žitaricama i namirnicama nalazi, što je bezglutenska prehrana te kako postupati s namirnicama koje ne sadrže gluten. Odgovori ispunjenih anketa obrađeni su uz pomoć programa Microsoft Office Excel 2007.

### 3.1.3. Kemikalije

Pri izradi diplomskog rada korišteni su sljedeći reagensi iz seta za ELISA test, RIDASCREEN® Gliadin (R7001), proizvođača R-Biopharm AG, Njemačka:

- bočice s 6 glijadinskih standarda, 1,3 mL svakog (0 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 40 ppb i 80 ppb glijadina u vodenoj otopini, pripremljene za upotrebu)
- bočica s konjugatom (1,2 mL), antitijelo konjugirano s peroksidazom, koncentrat
- bočica sa supstratom (7 mL), sadrži urea peroksid
- bočica s kromogenom (7 mL), sadrži tetrametilbenzidin
- bočica sa stop otopinom (14 mL), sadrži 1 N sumpornu kiselinu
- bočica s razrjeđivačem uzoraka (60 mL), koncentriran 5x
- bočica s puferom za ispiranje (100 mL), koncentriran 10x

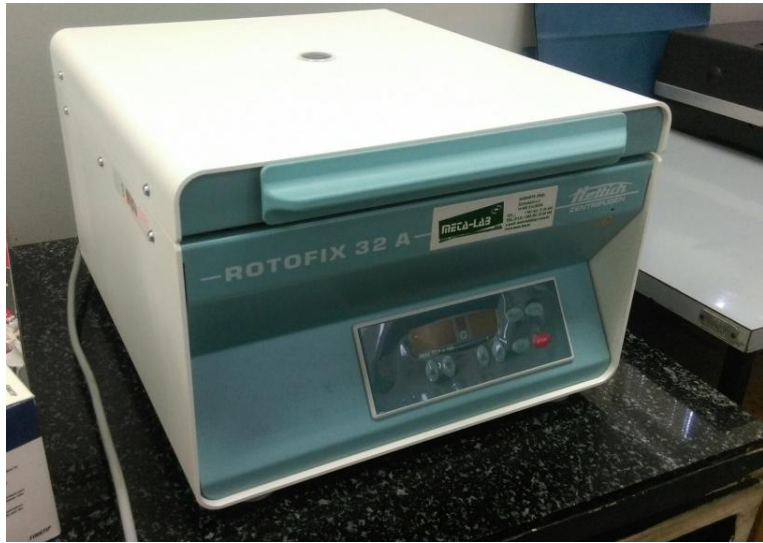
Dodatni reagensi koji su potrebni, a nisu osigurani u kitu za ELISA test:

- destilirana voda
- Cocktail (patentirana) (R7006, 105 mL) otopina
- 96%-tni etanol
- 80%-tni etanol

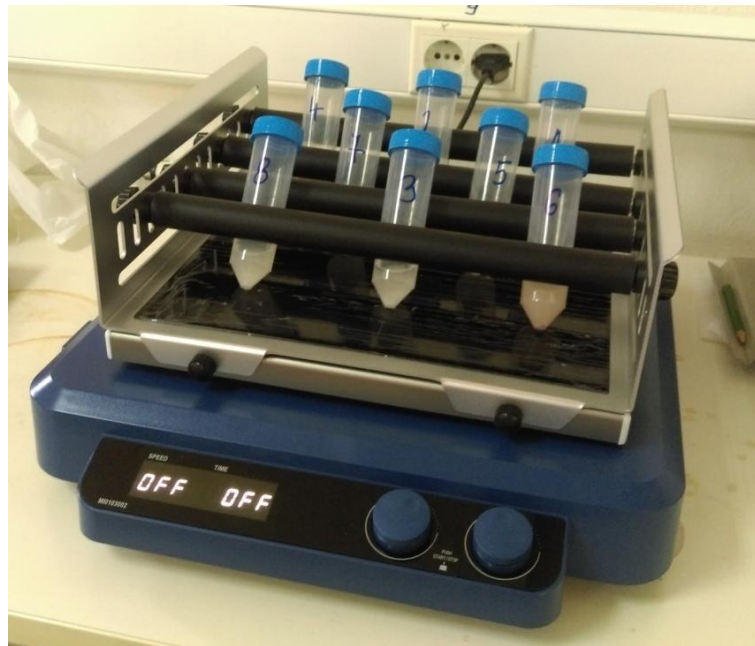
### 3.1.4. Laboratorijska oprema i pribor

Tijekom istraživanja korišteni su sljedeći uređaji:

- analitička vaga, (YMC Chyo, tip JK-180 Mikrotehna, Zagreb)
- mlinac, (Waring, tip HGB2WTS3, SAD)
- vortex miješalica (VWR, tip VV3)
- vodena kupelj (INKO, Zagreb)
- centrifuga (Rotofix 32A, Hettich, Njemačka) (Slika 4)
- tresilica (Four E's Scientific, tip MI0103002) (Slika 5)
- ELISA Microplate reader s uključenim računalnim programom RIDA SOFT Win (Z9999) (Slika 6)



Slika 4. Centrifuga



Slika 5. Tresilica



Slika 6. ELISA Microplate reader

Tijekom istraživanja korišteno je sljedeće posuđe i pribor:

- automatska pipeta
- nastavci za pipetu
- plastične žličice
- plastične epruvete
- staklena čaša od 100 mL
- staklena čaša od 250 mL
- staničevina
- mikrotitarska ploča s 96 jažica (12 traka s 8 jažica)

### 3.2. METODE RADA

Uzorci u kojima se određuje količina glutena pripremaju se na specifičan način i u posebnim uvjetima, kako bi se spriječila mogućnost kontaminacije.

Uzorci se najprije homogeniziraju uz pomoć mlinca koji je dobro opran, osušen i dezinficiran 96%-tnim alkoholom. Nakon meljave svakog pojedinog uzorka, mlinac se mora na navedeni način dobro očistiti kako bi se spriječila križna kontaminacija, odnosno među zagađenje uzoraka. Nakon meljave uzorak je do provedbe analize pospremljen u plastične vrećice sa zatvaračem.

U posebno označene kivete s čepom važe se 0,25 g dobro homogeniziranog uzorka koji je zatim spreman za ekstrakciju Cocktail (patentirana) otopinom prema principu rada s ELISA kitom.

### 3.2.1. Princip rada s ELISA kitom

Korišteni test s obzirom na princip predstavlja „sendvič“ ELISA test, a osnova testa je reakcija antigen-protutijelo. Jažice mikrotitarske ploče presvučene su specifičnim protutijelima na glijadin. Dodavanjem standardne otopine ili uzorka u jažice, prisutni glijadin vezat će se na specifična protutijela na zidovima jažica, a rezultat je nastajanje kompleksa antigen-protutijelo. Komponente koje se nisu vezale na protutijela uklanjaju se u koracima ispiranja. Zatim se dodaje protutijelo konjugirano na peroksidazu (enzimski konjugat). Protutijelo-konjugat veže se na kompleks protutijelo-antigen i stvara se antitijelo-antigen-antitijelo („sendvič“) kompleks. Bilo koji nevezani enzimski konjugat uklanja se u koraku ispiranja. Potom se u jažice dodaje enzimski supstrat i kromogen. Vezani enzimski konjugat pretvara bezbojni kromogen u plavo obojeni produkt. Dodatak stop reagensa dovodi do promjene boje iz plave u žutu, a mjerenje se provodi na čitaču pri 450 nm. Apsorbancija je proporcionalna koncentraciji glijadina u uzorku.

#### 3.2.1.1. Ekstrakcija uzorka Cocktail (patentirana) otopinom

Gluten se ekstrahira iz uzoraka s 2,5 mL Cocktail (patentirana) otopine, miješa se na vortex miješalici 5-10 sekundi i inkubira na 50°C, 40 minuta u vodenoj kupelji.

Nakon što se kivete ohlade dodaje se 7,5 mL svježe pripremljenog 80%-tnog etanola. Uzorak se ponovo miješa na vortex miješalici, a potom se jedan sat miješa na tresilici, pri sobnoj temperaturi.

#### 3.2.1.2. Centrifugiranje i odvajanje supernatanta

Centrifugiranje kiveta s uzorkom provodi se u centrifugi pri najmanje 2500 okretaja/minuti tijekom 10 minuta. Nakon toga se supernatant odvaja u posebne epruvete s čepom.

#### 3.2.1.3. Priprema testa

Potrebno je izvaditi sve reagense na sobnu temperaturu prije upotrebe.

Pufer za razrjeđivanje uzoraka dan je kao koncentrat (5x). Stoga, potrebno ga je prethodno razrijediti i priprema se tako da se jedan dio originalne otopine koncentriranog pufera za razrjeđivanje razrjeđuje s četiri dijela destilirane vode (na primjer 3 mL koncentrata

pufera za razrjeđivanje s 12 mL destilirane vode, što je dovoljno za razrjeđivanje deset uzoraka). Pritom treba biti siguran da pufer nije kontaminiran s glijadinom. Tako pripremljena otopina ostaje stabilna na +4°C.

Specifični konjugat dan je kao koncentrat (11x). Koncentrat konjugata razrjeđuje se u omjeru 1:11 s destiliranom vodom (na primjer 200 µL koncentriranog konjugata s 2 mL destilirane vode, dovoljno je za 2 trake jažica).

Pufer za ispiranje također je dan kao koncentrat (10x). Prije upotrebe, pufer za ispiranje potrebno je razrijediti u omjeru 1:10 s destiliranom vodom (na primjer 100 mL koncentriranog pufera s 900 mL destilirane vode). Prije razrjeđivanja potrebno je otopiti moguće formirane kristale inkubacijom pufera u vodenoj kupelji na 37°C. Razrijeđeni pufer stabilan je na 2-8°C, 4 tjedna.

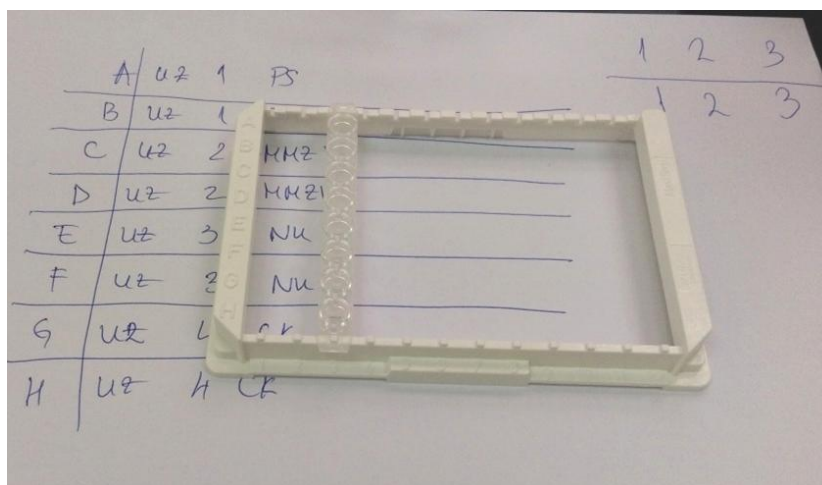
Uzorak se razrjeđuje u omjeru 1:12,5 s razrijeđenim puferom za razrjeđivanje (na primjer 80 µL uzorka s 920 µL razrijeđenog pufera za razrjeđivanje), a konačni faktor razrjeđenja iznosi 500, odnosno 1:500.

Za uzorke koji sadrže aproksimativno 100 mgkg<sup>-1</sup> glutena, preporuča se razrjeđenje 1:2500.

Nakon razrjeđenja uzorci su spremni za izvođenje testa.

#### 3.2.1.4. Izvođenje testa

Na samom početku umetne se dovoljan broj jažica u mikrotitarsku ploču (Slika 7) za sve standarde i uzorke, u duplikatu.



Slika 7. Mikrotitarska ploča s umetnutim jažicama

Dodaje se 100  $\mu\text{L}$  svake otopine standarda ili uzorka u odvojene jažice u duplikatu nakon čega slijedi inkubacija 30 minuta, na sobnoj temperaturi.

Nakon inkubacije potrebno je izliti tekućinu iz jažica, naglim okretanjem, a potom tapkanjem mikrotitarske pločice snažno gore-dolje (tri puta) od upijajući papir, kako bi osigurali potpuno uklanjanje tekućine iz jažica. Zatim se u svaku jažicu dodaje 250  $\mu\text{L}$  razrijeđenog pufera za ispiranje, tekućina se ponovno izlijeva i mikrotitarska pločica se tapka od upijajući papir. Isti postupak potrebno je ponoviti još dva puta.

Nakon ispiranja, dodaje se 100  $\mu\text{L}$  razrijeđenog konjugata u svaku jažicu, a zatim slijedi inkubacija 30 minuta, na sobnoj temperaturi.

Nakon inkubacije ponovno slijedi ispiranje tri puta na isti način kako je prethodno opisano.

Poslije ponovnog ispiranja, dodaje se 50  $\mu\text{L}$  supstrata i 50  $\mu\text{L}$  kromogena u svaku jažicu. Potrebno je nježno protresti mikrotitarsku ploču, a zatim slijedi inkubacija 30 minuta, na sobnoj temperaturi u mraku.

Razvijanje plave boje rezultat je veze s detektorskim antitijelom, a intenzitet obojenja ukazuje na količine glutena u uzorku.

Dodavanjem 100  $\mu\text{L}$  stop reagensa u svaku jažicu, plavo obojenje se mijenja u žuto, a potom slijedi očitavanje na čitaču.

#### *3.2.1.5. Očitavanje na čitaču*

Očitavanje na čitaču, na 450 nm, treba se provesti unutar 30 minuta od dodavanja stop reagensa.

Uz pomoć dobivenih vrijednosti apsorbancija za standarde potrebno je prvo nacrtati baždarnu krivulju. Potom se sa baždarne krivulje, na temelju apsorbancije dobivene za svaki uzorak, očita koncentracija glijadina u  $\mu\text{gkg}^{-1}$  (ppb) u uzorku. Dobivenu vrijednost potrebno je pomnožiti s preporučenim faktorom razrjeđenja. Nadalje, taj se rezultat treba pomnožiti s 2 kako bi se odredila koncentracija glutena, s obzirom kako glijadin obično predstavlja 50% proteina prisutnog u glutenu. Za konverziju iz ppb ( $\mu\text{gkg}^{-1}$ ) u ppm ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) rezultat je potrebno podijeliti s 1000.

Limit detekcije metode iznosi 1,5  $\text{mgkg}^{-1}$  (ppm) glijadina ili do 3  $\text{mgkg}^{-1}$  (ppm) glutena, a limit kvantifikacije iznosi 2,5  $\text{mgkg}^{-1}$  (ppm) glijadina ili do 5  $\text{mgkg}^{-1}$  (ppm) glutena.



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U svrhu izrade ovog diplomskog rada uz pomoć „sendvič“ ELISA testa, RIDASCREEN® Gliadin (R7001), određen je udio proteina glutena u bezglutenskim proizvodima iz različitih ugostiteljskih objekata (slastičarnice, prodavaonice brze hrane, restorani) i prodavaonica u kojima se prodaju bezglutenski proizvodi hrvatskog podrijetla. Pritom su za potrebe istraživanja odabrani uzorci koji su ili vidljivo navedeni kao bezglutenski, ili su prema sastavu prirodno bezglutenski, ili je od strane kuhara/ica ili poslužitelja/ica usmeno rečeno da su proizvodi bezglutenski. Uzorci su podijeljeni u skupine slastica, složenih jela i pekarskih proizvoda. Osim toga, proveden je upitnik kako bi se ispitalo znanje o glutenu, bezglutenskoj prehrani, kao i o načinu rukovanja bezglutenskim namirnicama i pripremi bezglutenskih proizvoda, među kuharima/icama ili poslužiteljima/icama u ugostiteljskim objektima, koji u svojoj ponudi imaju bezglutenske proizvode. Također, proveden je kako bi se ispitala i njihova osviještenost o mogućnosti kontaminacije bezglutenskih proizvoda. Rezultati određivanja udjela glutena ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) prikazani su u Tablicama 3 do 5, a odgovori na pitanja iz upitnika prikazani su grafički na Slikama 8 do 20.

### 4.1. UDIO PROTEINA GLUTENA ODREĐEN ELISA TESTOM U BEZGLUTENSKIM PROIZVODIMA

Rezultati istraživanja u Tablicama 3 do 5 prikazuju udjele proteina glutena određene u uzorcima iz skupine slastica, složenih jela i pekarskih proizvoda. Udio glutena u tim proizvodima kreće se u rasponu od manje od  $5 \text{ mgkg}^{-1}$ , odnosno ispod limita kvantifikacije, do  $145,91 \text{ mgkg}^{-1}$  (Uzorak 14, palačinka). Pritom od 27 ispitanih uzoraka 21 uzorak (77,8%) ima udio glutena manji od  $5 \text{ mgkg}^{-1}$ , odnosno ispod limita kvantifikacije, a u preostalih 6 uzoraka (22,2%) udio glutena je iznad  $5 \text{ mgkg}^{-1}$  uzorka. Od 6 uzoraka 4 uzorka (66,7%) imaju udio glutena veći od  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ .

Rezultati u Tablici 3, prikazuju da je u skupini slastica najviši udio glutena određen u Uzorku 14 ( $145,91 \text{ mgkg}^{-1}$ ), a slijedi ga Uzorak 8 ( $95,64 \text{ mgkg}^{-1}$ ). Prema Uredbi (EU) br. 828/2014 Uzorak 14 (palačinka) ne spada u bezglutenske proizvode jer je udio glutena veći od  $100 \text{ mgkg}^{-1}$  uzorka, dok se Uzorak 8 (kolač od đumbira i mrkve) može navoditi kao proizvod s vrlo malim sadržajem glutena, jer je udio glutena veći od  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ , ali manji od

100 mgkg<sup>-1</sup> uzorka. U ostalim uzorcima udio glutena je ispod limita kvantifikacije, te prema Uredbi 828/2014 mogu se smatrati i navoditi kao proizvodi bez glutena.

Tablica 3. Prikaz rezultata sadržaja glutena dobivenih ELISA metodom u slasticama koje su označene da ne sadrže gluten

Uzorci		Srednja vrijednost Å	Izračunato ngmL <sup>-1</sup>	*faktor množenja	Glijadin mgkg <sup>-1</sup>	gluten mgkg <sup>-1</sup> (ppm)
<b>Slasticice</b>						
<b>Uzorak 1</b>	kolač od đumbira i mrkve	0,083	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 2</b>	kolač krempita	0,050	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 3</b>	kolač od borovnice	0,064	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 4</b>	kolač od limuna i badema	0,103	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 5</b>	kolač od orašastih plodova	0,050	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 6</b>	kolač od vanilije i marelice	0,055	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 7</b>	muffin s vanilijom	0,056	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 8</b>	kolač od badema i naranče	0,749	19,13	2500	47,82	95,64
<b>Uzorak 9</b>	keksi od indijskih oraščića	0,052	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 10</b>	keksi od heljde	0,086	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 11</b>	keksi od oraha	0,055	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 12</b>	keksi od vanilije	0,061	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 13</b>	palačinka	0,115	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 14</b>	palačinka	1,123	29,18	2500	72,86	145,91
<b>Uzorak 15</b>	sladoled	0,053	<5,00	500	<2,50	<5,00

U skupini složenih bezglutenskih jela, prikazanih u Tablici 4, udio glutena kvantificiran je u 3 uzorka, Uzorku 16, Uzorku 18 i Uzorku 19. Pritom je najviši udio određen u Uzorku 16

(105,10 mgkg<sup>-1</sup>), a zatim u Uzorku 19 (72,03 mgkg<sup>-1</sup>). Prema Uredbi 828/2014 Uzorak 16 (pizza capricciosa) ne može se smatrati bezglutenskim jer je udio glutena u tom uzorku veći od 100 mgkg<sup>-1</sup>. Uzorak 19 (sendvič u bezglutenskoj lepinji s pljeskavicom od kvinoje, vučjeg boba i slanutka) se može navoditi kao proizvod koji ima vrlo mali sadržaj glutena jer je udio glutena u uzorku veći od 20 mgkg<sup>-1</sup>, a manji od 100 mgkg<sup>-1</sup> uzorka. Nasuprot tome, Uzorak 18 (toast sendvič od šunke i sira) ima udio glutena manji od 20 mgkg<sup>-1</sup> uzorka, pa prema tome se može navoditi kao proizvod bez glutena, zajedno s preostalim uzorcima u kojima je udio glutena ispod limita kvantifikacije. Oliveira i sur. (2014) proveli su istraživanje kako bi se procijenila kontaminacija glutenom u grahu serviranom u samoposlužnim restoranima u Brazilu, a koji se priprema s više sastojaka, koji ne sadrže gluten. Od 60 uzoraka u 20 različitih restorana, 10 uzoraka (16,66%) pokazalo je udio glutena veći od 20 mgkg<sup>-1</sup> iz razloga što ne postoji standardizacija u pripremi graha, a kuhari često koriste pšenično brašno kako bi zgusnuli bujon graha i brže ga pripremili. Takvi postupci predstavlja skriveni rizik za osobe s celijakijom, ali i ukazuje na važnost edukacije kuhara koji pripremaju jela, što se može zaključiti i na temelju rezultata u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz rezultata sadržaja glutena dobivenih ELISA metodom u složenim jelima koja su označena da ne sadrže gluten

Uzorci		Srednja vrijednost Å	Izračunat o ngmL <sup>-1</sup>	*Faktor množenja	Glijadin mgkg <sup>-1</sup>	Gluten mgkg <sup>-1</sup> (ppm)
<b>Složena jela</b>						
<b>Uzorak 16</b>	pizza capricciosa	0,823	21,02	2500	52,55	105,10
<b>Uzorak 17</b>	falafel sa salatam	0,058	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 18</b>	toast sendvič od šunke i sira	0,214	5,61	500	2,80	5,61
<b>Uzorak 19</b>	sendvič u bezglutenskoj lepinji s pljeskavicom od kvinoje, vučjeg boba i slanutka	1,933	72,03	500	36,01	72,03
<b>Uzorak 20</b>	zlevka s bučom	0,059	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 21</b>	prženi krumpirići	0,051	<5,00	500	<2,50	<5,00

U Tablici 5 prikazani su rezultati za skupinu pekarskih proizvoda koji su označeni da ne sadrže gluten. Pritom je samo za Uzorak 27 (kruh sa sjemenkama) kvantificiran udio glutena ( $7,53 \text{ mgkg}^{-1}$ ). S obzirom da je udio glutena u svim uzorcima manji od  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ , prema Uredbi 828/2014 svi proizvodi iz ove skupine mogu se navoditi kao proizvodi bez glutena. U istraživanje u Brazilu koje su proveli Farage i sur. (2016), na puno većem uzorku od 130 analiziranih bezglutenskih pekarskih proizvoda, zabilježeno je 28 uzoraka (21,4%) s udjelom glutena iznad  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ . Tako visoki rezultati u tom istraživanju su očekivani zbog velike manipulacije pšeničnim brašnom u pekarama, pa je stoga i veća opasnost od kontaminacije. Međutim, s obzirom da za potrebe ovog istraživanja nismo pronašli klasičnu pekaru koja uz proizvode koji sadrže gluten proizvodi i bezglutenske proizvode, već je riječ uglavnom o manjim tvrtkama koje proizvode isključivo bezglutenske pekarske proizvode, potvrđena su očekivanja niskih udjela glutena.

Tablica 5. Prikaz rezultata sadržaju glutena dobivenih ELISA metodom u pekarskim proizvodima koji su označeni da ne sadrže gluten

Uzorci		Srednja vrijednost Å	Izračunato $\text{ngmL}^{-1}$	*Faktor množenja	Glijadin $\text{mgkg}^{-1}$	Gluten $\text{mgkg}^{-1}$ (ppm)
<b>Pekarski proizvodi</b>						
<b>Uzorak 22</b>	bijeli kruh	0,085	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 23</b>	baguette	0,130	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 24</b>	pecivo sa sjemenkama	0,069	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 25</b>	bijelo pecivo	0,048	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 26</b>	kruh sa sjemenkama	0,155	<5,00	500	<2,50	<5,00
<b>Uzorak 27</b>	kruh sa sjemenkama	0,299	7,53	500	3,77	7,53

Iz razloga što je konsenzus među znanstvenicima kako, s obzirom na prag osjetljivosti svakog oboljelog, dnevna konzumacija glutena ne bi trebala prijeći 50 mg (Ciclitira i sur., 2005; Catassi i sur., 2007) u osoba oboljelih od celijakije, izračunata je količina glutena koju bi osoba unijela jednom porcijom pojedinog uzorka. Izračunata količina glutena u serviranoj porciji analiziranih uzoraka u kojima je utvrđen gluten veći od limita kvantifikacije metode prikazana je u Tablici 6.

Tablica 6. Količina glutena u serviranoj porciji analiziranih uzoraka

Uzorci		Masa servirane porcije (g)	Količina glutena u serviranoj porciji (mg)
<b>Uzorak 8</b>	kolač od badema i naranče	117	11,19
<b>Uzorak 14</b>	palačinka	180	26,26
<b>Uzorak 16</b>	pizza capricciosa	440	46,24
<b>Uzorak 18</b>	toast sendvič od šunke i sira	210	1,18
<b>Uzorak 19</b>	sendvič u bezglutenskoj lepinji s pljeskavicom od kvinoje, vučjeg boba i slanutka	300	21,61
<b>Uzorak 27</b>	kruh sa sjemenkama	50	0,38

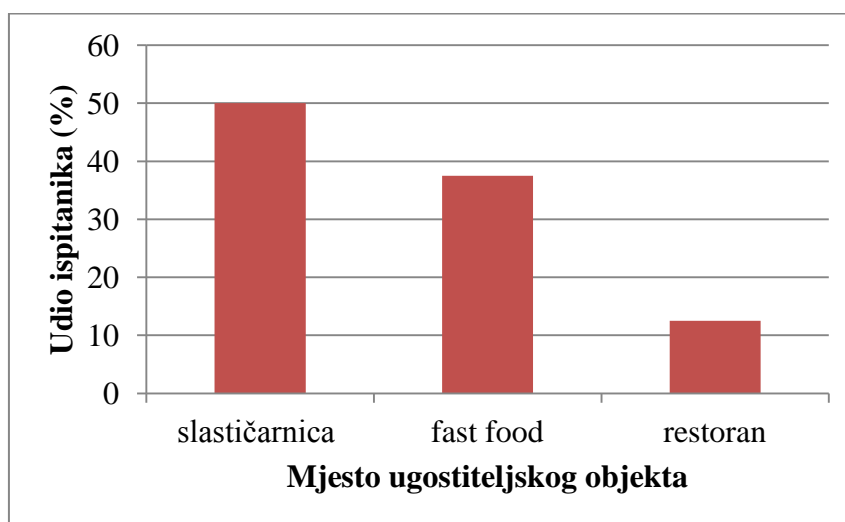
Prema izračunu količine glutena u serviranoj porciji analiziranih uzoraka, uočeno je kako već unosom, na primjer jedne bezglutenske palačinke, bezglutenske pizze capricciose i jednog sendviča u bezglutenskoj lepinji s pljeskavicom u jednom danu, osoba unese puno više od granice koju navode Catassi i sur. (2007). Stoga, osobe koje konzumiraju bezglutenske proizvode, iz zdravstvenih razloga, trebaju biti na oprezu. Također, proizvođači bi trebali pažljivije pripremati bezglutenske proizvode i paziti da prilikom pripreme ne dođe do kontaminacije.

Međutim, valja naglasiti da unatoč tome što je ELISA R5 metoda po Mendezu prihvaćena kao glavna metoda za određivanje udjela glutena u hrani, od strane Codex Alimentarius (1979 rev. 2008), ova tehnika zahtjeva prisutnost najmanje dva epitopa u proteinu ili peptidu kako bi se detektirao gluten. Stoga, ukoliko je tijekom pripreme pojedinih

proizvoda došlo do hidrolize proteina glutena na peptide koji sadrže samo jedan toksični epitop (Mena i sur., 2012), rezultati u konačnici mogu biti podcijenjeni.

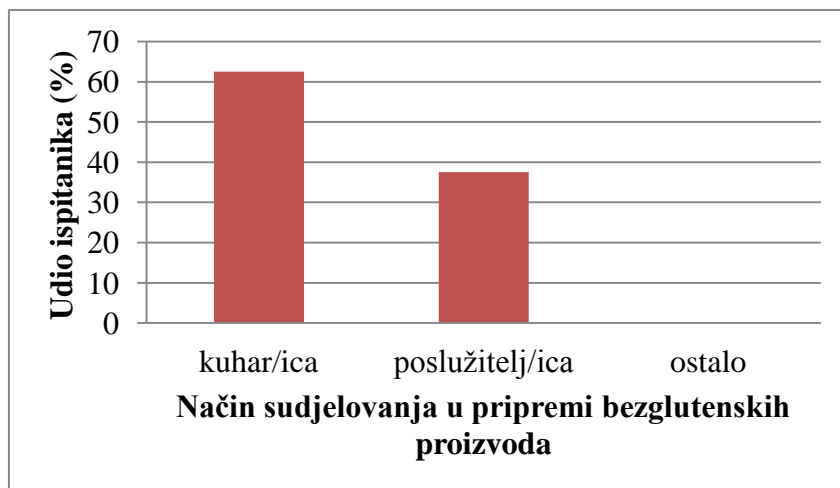
#### 4.2. UPITNIK O GLUTENU I BEZGLUTENSKIM PROIZVODIMA

Kao dio ovog istraživanja proveden je upitnik među kuharima/icama i poslužiteljima/icama ugostiteljskih objekata gdje su prikupljeni uzorci, a koji u svojoj ponudi imaju bezglutenske proizvode. Nisu svi pristali ispuniti anketu tako u konačnici anketu je ispunilo svega 8 ispitanika u dobi od 19 do 52 godine, od kojih su 25% (n=2) bile žene, a 75% (n=6) muškarci. Ispitalo se njihovo znanje o glutenu, bezglutenskoj prehrani, načinu rukovanja i pripreme bezglutenskih proizvoda, kao i o osviještenosti o mogućnostima kontaminacije proizvoda. Upitnik je ukupno sadržavao 17 pitanja. Odgovori na pitanja iz upitnika prikazani su na slikama 8 do 20.



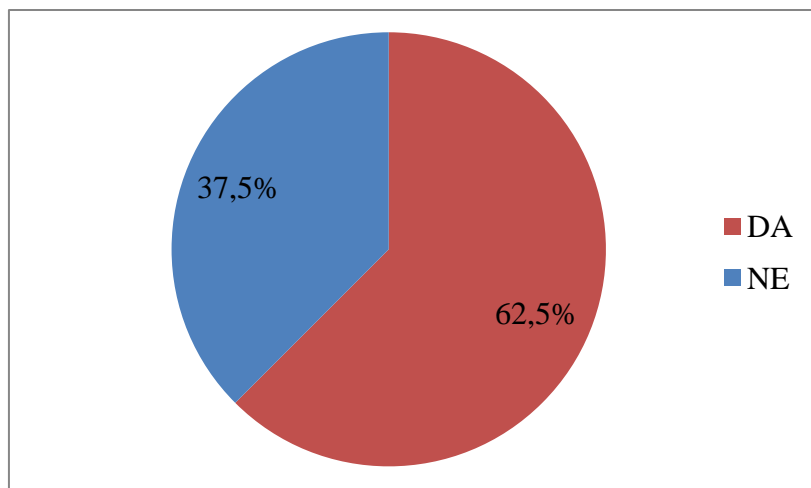
Slika 8. Mjesto zaposlenja osoba koje su pristale sudjelovati u upitniku (n=8)

Najviše ispitanika koji su pristali sudjelovati u upitniku radi u slastičarnici (50%), a najmanje u restoranu (12,5%) (Slika 8). Pritom, većina ispitanika sudjeluje u pripremi kao kuhar ili kuharica (62,5%), a ostali ispitanici sudjeluje kao poslužitelj ili poslužiteljica (Slika 9).



Slika 9. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Na koji način sudjelujete u pripremi bezglutenskih proizvoda?“

Više od polovice ispitanika (n=5; 62,5%) čulo je za celijakiju, a ostatak nije čuo za celijakiju (n=3; 37,5%) (Slika 10). Unatoč malom broju ispitanika, rezultati pokazuju na slabiju upućenost ispitanika o zdravstvenom problemu kojeg gluten može izazvati, iako sudjeluju u pripremi ili posluživanju bezglutenskih proizvoda. Ipak, potrebno je provesti istraživanje s većim brojem ispitanika kako bi se istražila svijest hrvatskih kuhara o prisutnosti celijakije kao poremećaja. Ipak, u većim studijama koje su provedene u Engleskoj, Sjedinjenim Američkim Državama i na Novom Zelandu uočeno je povećanje svijesti o celijakiji kroz godine (Karajeh i sur., 2005; Aziz i sur., 2014; Simpson i sur., 2011; Schultz i sur., 2017). U istraživanju koje su 2003. godine proveli Karajeh i sur. (2005) u Engleskoj, od 322 ispitana kuhara 55 ih je odgovorilo potvrdno (17,1%). Međutim, 2013. godine, nakon 10 godina ponovljeno je isto istraživanje te je uočeno povećanje svijesti o postojanju celijakije kao poremećaja povezanog s glutenom. Pritom je sudjelovalo 265 kuhara od kojih je 207 odgovorilo potvrdno, te se postotak povisio na 78,1%, što je puno više nego u prethodnoj studiji (Aziz i sur., 2014). Nadalje, Simpson i sur. (2011) proveli su istraživanje u kojem je od 430 ispitanih kuhara njih 330 odgovorilo potvrdno (77%), a u najnovijem istraživanju na Novom Zelandu (Schultz i sur., 2017) od 90 ispitanih kuhara, 78 kuhara odgovorilo je potvrdno (87%).



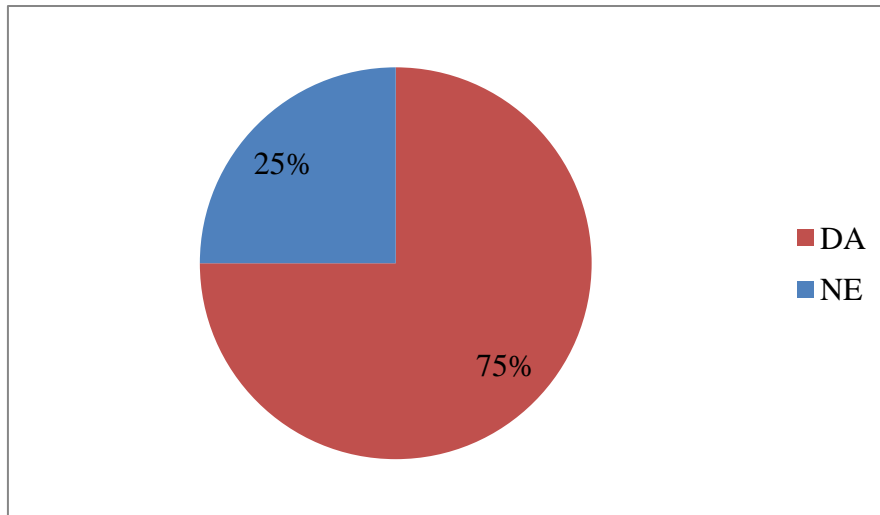
Slika 10. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Jeste li čuli za celijakiju?“

Unatoč tome što neki od ispitanika nisu čuli za celijakiju, svi ispitanici su čuli za bezglutensku prehranu. Ove rezultate potvrđuje i istraživanje koje su proveli Schultz i sur. (2017) gdje su svi ispitanici bili upoznati s bezglutenskom prehranom. Takvi rezultati su i očekivani s obzirom na povećani publicitet bezglutenske prehrane putem časopisa, novina, knjiga i interneta.

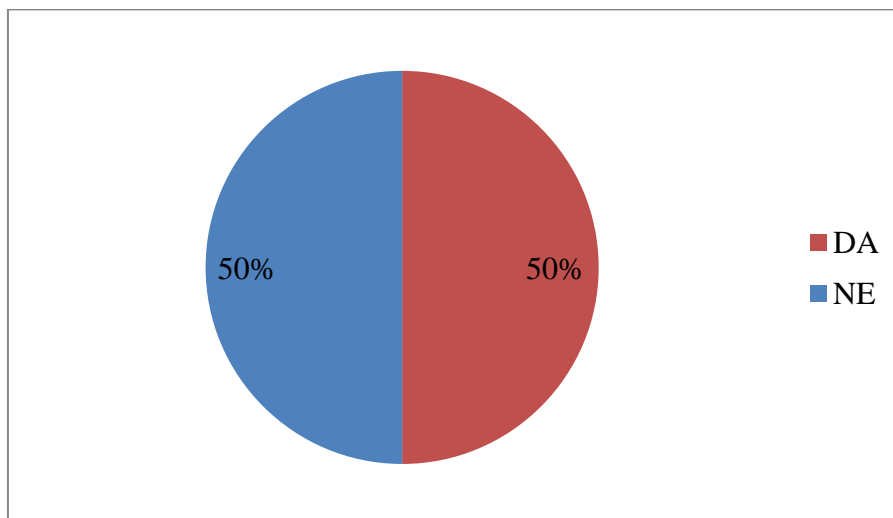
Nadalje, iznenađujuće je da nitko od ispitanika nije prošao edukaciju o pripremi ili posluživanju bezglutenske hrane. Iako se na ovako malom uzorku ispitanika ne može generalizirati, izostanak edukacije zaposlenika zasigurno povećava mogućnost kontaminacije prilikom pripreme ili posluživanja bezglutenskih jela. S obzirom da je u 4 uzorka od 27 uzoraka određen udio glutena veći od  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ , edukacija zaposlenika vrlo je važna kako bi se smanjio broj kontaminiranih uzoraka i povećala sigurnost osoba koje bezglutensku prehranu provode iz zdravstvenih razloga

Na pitanje o postojanju HACCP protokola za pripremu bezglutenskih proizvoda (Slika 11) većina ispitanika (n=6) odgovorila je potvrdno. Međutim u sljedećem pitanju o korištenju različitog posuđa, pribora i posebnih polica, od onih koji se koriste za proizvode s glutenom (Slika 12) polovica je odgovorila potvrdno, a polovica je odgovorila „ne“. U istraživanju koje su proveli Schultz i sur. (2017), 75,6% ispitanih kuhara nije bilo svjesno važnosti i potrebe protokola kao i odvojenog pribora, posuđa i površina za pripremu kako bi se osiguralo da hrana budu bezglutenska. Stoga, osim što je važna edukacija zaposlenika, vrlo je važno osigurati odvojeno posuđe, pribor, police kao i dijelove kuhinje u kojima će se posebno pripremati bezglutenski proizvodi, jer se na taj način nastoji smanjiti mogućnost kontaminacije.



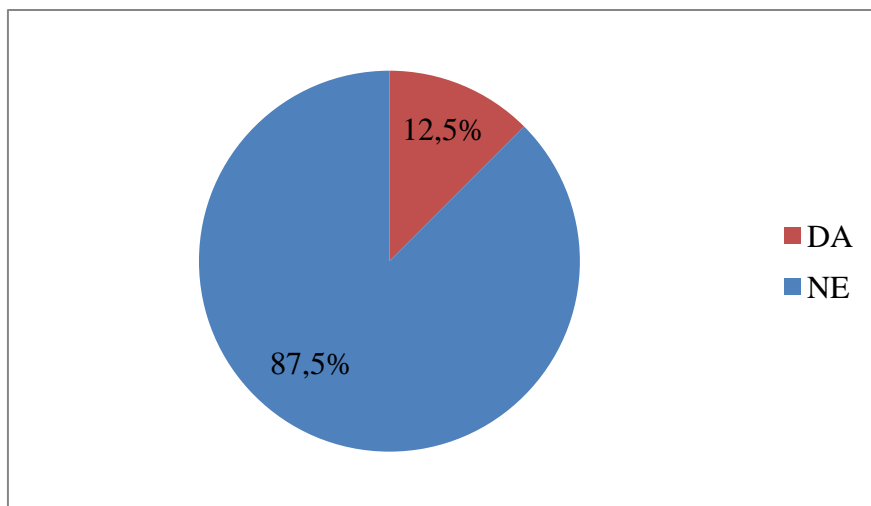


Slika 11. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Postoji li u vašoj kuhinji HACCP protokol za pripremu bezglutenskih obroka?“



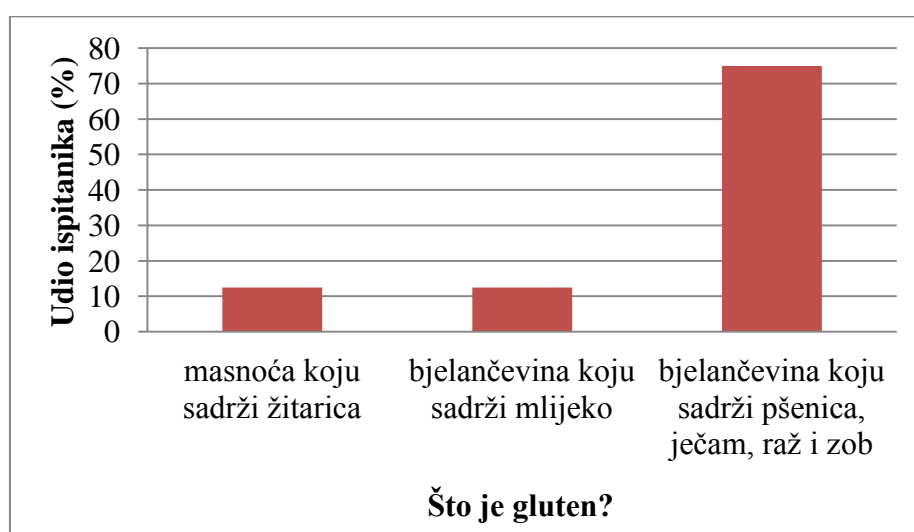
Slika 12. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Koristite li prilikom pripreme/posluživanja bezglutenskih proizvoda drugo posuđe, pribor i posebne police, od onih koje koristite za pripremu/posluživanje ostalih proizvoda?“

Također, kao što prikazuju rezultati na Slici 13, samo jedan (12,5%) od osam ispitanika odgovorio je da bezglutenske proizvode pripremaju u prostorijama odvojenim od onih gdje se pripremaju i ostali proizvodi. Ovakav rezultat ponovno ukazuje na povećanu mogućnost kontaminacije bezglutenskih proizvoda jer ukoliko, u istom prostoru gdje se pripremaju bezglutenski proizvodi, dolazi do manipulacije na primjer pšeničnim brašnom, vrlo lako može doći do kontaminacije.



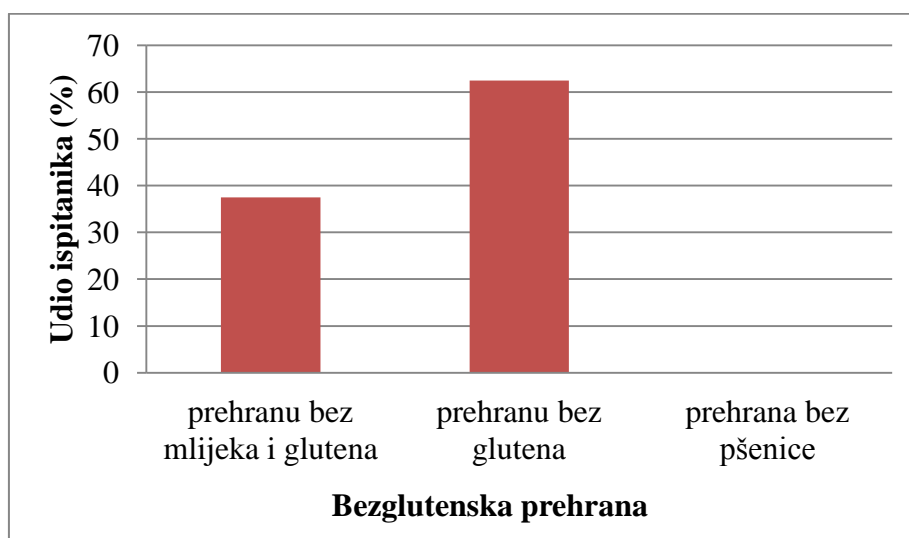
Slika 13. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Pripremaju li se bezglutenski proizvodi u odvojenim prostorijama od onih gdje se pripremaju ostali proizvodi?“

Većina ispitanika je točno definirala gluten (Slika 14), ali jedan ispitanik odgovorio je netočno da je gluten masnoća, te je još jedan ispitanik netočno odgovorio da je gluten bjelančevina koju sadrži mlijeko. Unatoč malom broju ispitanika, ovakvi rezultati pokazuju da među pojedincima postoje poteškoće u definiranju što je gluten. Također, upitnik koje je provela organizacija NSF International među 1,012 Amerikanaca o njihovom znanju o glutenu, uočeno je da iako je većina ispitanika čula za gluten (90%), većina ima poteškoća oko definiranja što je gluten. Pritom, gluten je točno definiralo samo 35% ispitanika (Arbor, 2015).



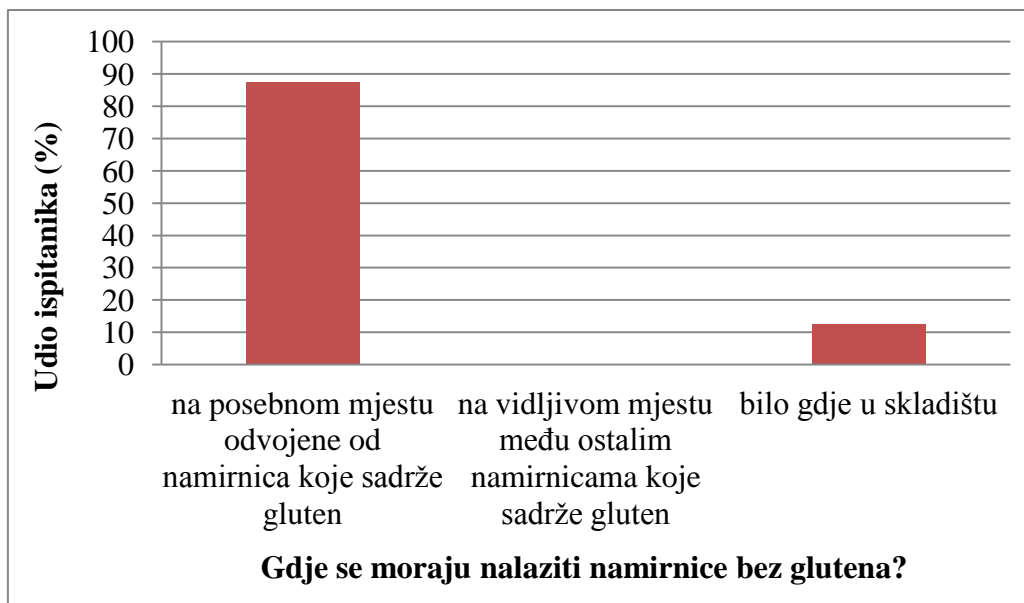
Slika 14. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Gluten je:“

Iako su svi ispitanici čuli za bezglutensku prehranu, rezultati prikazani na Slici 15 ukazuju na poteškoće oko definiranja što je bezglutenska prehrana. Većina ispitanika (n=5; 62,5%) je odgovorilo je točno, međutim 37,5% (n=3) ispitanika odgovorilo je kako bezglutensku prehranu podrazumijeva prehrana bez mlijeka i glutena. Time se ponovno ukazuje na potrebu za edukacijom, osobito u ugostiteljskim objektima koji u svojoj ponudi imaju bezglutenske proizvode kako bi se razjasnilo što se podrazumijeva pod pojmom bezglutenske prehrane.



Slika 15. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Bezglutenska prehrana podrazumijeva:“

Nadalje, većina ispitanika je svjesna (n=7; 87,5% u oba pitanja) (Slika 16 i Slika 17) kako se namirnice koje sadrže gluten moraju nalaziti na posebnom mjestu, te da se bezglutenski kruh treba odvojeno rezati, servirati i prenositi od namirnica koje sadrže gluten. Međutim, kao što je prethodno prikazano na Slici 12 polovica ispitanika se izjasnila da uistinu koristi odvojeno posuđe, pribor i police od onih koje koriste za hranu koja sadrži gluten.



Slika 16. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Namirnice bez glutena moraju biti:“



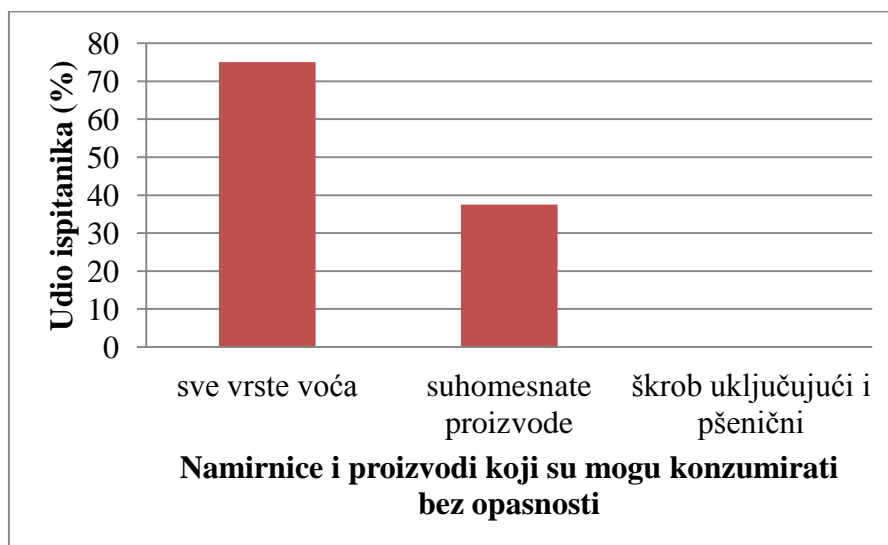
Slika 17. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Bezglutenski kruh:“

Kao što postoje poteškoće u definiranju što je gluten, također uočene su poteškoće oko sličnog pitanja, odnosno u kojim žitaricama se nalazi gluten (Slika 18). Pritom je polovica ispitanika točno odabralo da su to pšenica, ječam, raži i zob, dok je druga polovica ispitanika netočno odgovorila da su to pšenica, kukuruz, raž i zob.



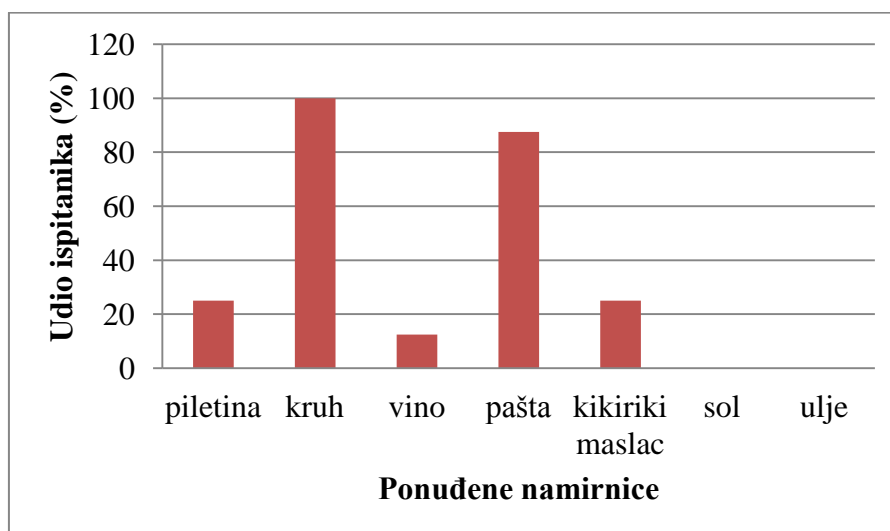
Slika 18. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Gluten se nalazi u:“

Kao što je već rečeno, gluten može biti skriveni sastojak različitih proizvoda pa tako i suhomesnatih proizvoda. Iako je većina ispitanika točno odgovorila da se u bezglutenskoj prehrani bez opasnosti može konzumirati sve vrste voća (Slika 19), neki su ispitanici odgovorili da se bez opasnosti također mogu konzumirati i suhomesnati proizvodi (37,5%).



Slika 19. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Osobe na bezglutenskoj prehrani mogu bez opasnosti konzumirati:“

Rezultati prikazani na Slici 20 prikazuju da su svi ispitanici točno odabrali kruh te da je većina (n=7) točno odabrala paštu, kao namirnice koje sadrže gluten. Međutim, među ponuđenim namirnicama, kao one koje sadrže gluten, dva ispitanika odabralo je piletinu, dva ispitanika je odabralo kikiriki maslac, dok je jedan ispitanik odabrao vino. U istraživanju koje su proveli Simpson i sur. (2011), većina kuhara točno je odabrala kruh (90%) i paštu (90%) kao namirnice koje sadrže gluten, ali značajna manjina netočno je odabrala kikiriki maslac (16%), vino (10%), piletinu (4%), ulje (3%) i sol (3%), kao namirnice koje sadrže gluten. Stoga ukoliko kuhari/ice i poslužitelji/ice nisu prošli formalnu edukaciju o tome koje namirnice sadrže gluten, a koje ne, postoji veća mogućnost da će doći kontaminacije bezglutenskih proizvoda prilikom pripreme ili posluživanja.



Slika 20. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=8) na pitanja „Od ponuđenih namirnica gluten sadrže:“

Codex Alimentarius (1979 rev. 2008) definirao je ELISA R5 metodu po Mendezu kao glavnu metodu za određivanje glutena u hrani. Stoga, u ovom istraživanju za potrebu izrade diplomskog rada, uz pomoć ELISA metode određen je udio proteina glutena u bezglutenskim proizvodima iz skupine slastica, složenih jela i pekarskih proizvoda. Na taj način ispitana je moguća kontaminacija u 27 različitih uzoraka, a udio glutena u tim proizvodima kreće se u rasponu od manje od  $5 \text{ mgkg}^{-1}$ , odnosno ispod limita kvantifikacije, do  $145,91 \text{ mgkg}^{-1}$ . Iako većina uzoraka, odnosno 21 uzorak (77,8%) ima udio glutena ispod limita kvantifikacije, 6 uzoraka (22,2%) ima udio glutena iznad  $5 \text{ mgkg}^{-1}$ . Od 6 uzoraka u kojim je kvantificiran udio glutena, proizvodima bez glutena prema Uredbi 828/2014 mogu se smatrati samo 2 uzorka,

jer preostala 4 uzorka imaju udio glutena iznad  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ . S obzirom da kontaminacija predstavlja skriveni rizik za osobe koje iz zdravstvenih razloga izbjegavaju gluten, potrebno je obratiti veću pozornost na sprječavanje kontaminacije bezglutenskih proizvoda. Također, osobe koje moraju izbjegavati gluten trebaju biti na oprezu prilikom konzumacije hrane izvan svog doma. Kontaminacija se može umanjiti korištenjem odvojenih prostorija, odvojenih polica, pribora i posuđa od onih koji se koriste za proizvode koje sadrže gluten. Međutim, u upitniku koji je proveden kao dio ovog istraživanja, na malom broju ispitanik ( $n=8$ ) među kuharima/icama i poslužiteljima/icama, samo polovica ispitanika rekla je da koristi odvojene police, posuđe i pribor prilikom pripreme ili posluživanja bezglutenskih proizvoda. Osim toga, samo jedan od osam ispitanika odgovorio je potvrdno da koriste odvojenu prostoriju od one koja se koristi za pripremu proizvoda koji sadrže gluten. Iako je broj ispitanika malen ( $n=8$ ), uočena je potreba za edukacijom zaposlenika ugostiteljskih objekata koji u svojoj ponudi imaju bezglutenske proizvode, kako bi se na taj način spriječila kontaminacija i kako bi se osiguralo da bezglutenski proizvodi zbilja budu bezglutenski. Potreba za edukacijom uočena je i zbog poteškoća u definiranju što je gluten, što je bezglutenska prehrana i koje namirnice sadrže gluten. Stoga, unatoč malom broju ispitanika, provedeni upitnik mogao bi biti polazna točka za neko veće istraživanje na temelju kojeg će se donijeti ozbiljniji zaključci.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Za određivanje udjela glutena u bezglutenskim proizvodima iz skupina slastica, složenih jela i pekarskih proizvoda, korišten je ELISA (engl. *Enzyme – Linked Immunosorbent Assay*) test, a udio se kretao u rasponu od  $5 \text{ mgkg}^{-1}$ , odnosno ispod limita kvantifikacije, do  $145,91 \text{ mgkg}^{-1}$ .
2. Od dvadeset sedam uzoraka u četiri uzorka udio glutena bio je iznad  $20 \text{ mgkg}^{-1}$ , te se kao takvi ne mogu smatrati proizvodima „bez glutena“.
3. Zbog uočene kontaminacije, osobe koje konzumiraju bezglutenske proizvode iz zdravstvenih razloga, trebaju biti na oprezu prilikom konzumiranja hrane izvan svog doma.
4. U provedenom upitniku među kuharima/icama i poslužiteljima/icama samo polovica ispitanika u ugostiteljskim objektima za bezglutenske proizvode koriste odvojeno posuđe, pribor i police od onih koje koriste za proizvode s glutenom. Također samo jedan od osam ispitanika odgovorio je potvrdno da koristi odvojene prostorije od onih gdje se proizvode proizvodi s glutenom.
5. Unatoč malom broju ispitanika uočena je potreba za edukacijom kuhara/ica i poslužitelja/ica kako bi se povećala svijest o tome u kojim se namirnicama nalazi gluten i kako spriječiti kontaminaciju.



## 6. LITERATURA

Alonso-Llamazares, J., Gibson, L. E., Rogers, R. S. (2007) Clinical pathologic, and immunopathologic features of dermatitis herpetiformis: review of the Mayo Clinic experience. *Int. J. Dermatol.* **46**, 910 – 919.

Anderson, O. D. (2014, 23. srpnja) The Spectrum of Major Seed Storage Genes and Proteins in Oats (*Avena sativa*). *PLoS ONE* [online], <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083569>>. Pristupljeno 09. kolovoza 2017.

Anonymous 1 (2016) <<https://breadscience.weebly.com/gluten-structure.html>>. Pristupljeno 02. kolovoza 2017.

Anonymous 2 (2017) <[http://www.foodfromhome.eu/contents/en-uk/d2045760945\\_Gluten\\_Free.html](http://www.foodfromhome.eu/contents/en-uk/d2045760945_Gluten_Free.html)>. Pristupljeno 02. kolovoza 2017.

Araujo, H. M. C., Araujo, W. M. C. (2011) Coeliac disease. Following the diet and eating habits of participating individuals in the Federal District, Brazil. *Appetite* **57**, 105 – 109.

Arbor, A. (2015, 16. prosinca) NSF International Survey Finds U. S. Consumers Struggle to Define and Identify Gluten. NSF International – National Sanitation Foundation International, <<http://www.nsf.org/newsroom/nsf-survey-finds-us-consumers-struggle-to-define-identify-gluten>>. Pristupljeno, 19. rujna 2017.

Aziz, I., Mohammed, A., Zilkha, J., Tubman, E., Fowles, C., Sanders, D. S. (2014) Change in awareness of gluten – related disorders among chefs and the general public in the UK: a 10 – year follow – up study. *Eur. J. Gastroen. Hepat.* **26**, 1228 – 1233.

Balakireva, A. V., Zamyatnin, A. A. (2016) Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients* (objavljeno online 18. listopada 2016.). doi: 10.3390/nu8100644.

Barbarić, I. (2008) Celijakija – pregled i predviđanje. *Medicina Fluminensis* **44**, 229 – 234.

Bartusek, D., Valek, V., Husty, J., Uteseny, J. (2007) Small bowel ultrasound in patients with celiac disease. Retrospective study. *Eur. J. Radiol.* **63**, 302 – 306.

- Bascunan, K. A., Vespa, M. C., Araya, M. (2016) Celiac disease: understanding the gluten – free diet. *Eur. J. Nutr.* (objavljeno online 22. lipnja 2016.). doi: 10.1007/s00394-016-1238-5.
- Batista, I. C., Gandolfi, L., Nobrega, Y. K., Almeida, R. C., Almeida, L. M., Campos Junior, D., Pratesi, R. (2012) Autism spectrum disorder and celiac disease: no evidence for a link. *Arq. Neuropsiquiatr.* **70**, 28 – 33.
- BDA (2017) Eating without wheat, British Dietetic Association, Birmingham, <[https://www.bda.uk.com/foodfacts/eating\\_without\\_wheat.pdf](https://www.bda.uk.com/foodfacts/eating_without_wheat.pdf)>. Pristupljeno 15. rujna 2017.
- Bituh, M., Žižić, V., Panjkota Krbavčić, I., Zadro, Z., Colić Barić, I. (2011) Gluten – Free Products Are Insufficient Source of Folate and Vitamin B12 for Coeliac Patients. *Food Technol. Biotech.* **49**, 511-516.
- Biesiekierski, J. R. (2017) What is gluten? *J. Gastroen. Hepatol.* **32**, 78-81.
- Biesiekierski, J. R., Peters, S. L., Newnham, E. D., Rosella, O., Muir, J. G., Gibson, P. R. (2013) No effects of gluten in patients with self – reported non – celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short – chain carbohydrates. *Gastroenterology* **145**, 320 – 328.
- Blomfeldt, T. O. J., Kuktaite, R., Johansson, E., Hedenqvist, M. S. (2011) Mechanical Properties and Network Structure of Wheat Gluten Foams. *Biomacromolecules* **12**, 1707 – 1715.
- Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A.W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A., Plaut, M., Cooper, S. F., Fenton, M. J., Arshad, S. H., Bahna, S. L., Beck, L. A., Byrd – Bredbenner, C., Camargo, C. A. Jr., Eichenfield, L., Furuta, G. T., Hanifin, J. M., Jones, C., Kraft, M., Levy, B. D., Lieberman, P., Lucciolli, S., McCall, K. M., Schneider, L. C., Simon, R. A., Simons, F. E., Teach, S. J., Yawn, B. P., Schwaninger, J. M. (2010) Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID – sponsored expert panel. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, S1 – 58.
- 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.

- Brucke, T., Kollegger, H., Schmidbauer, M., Muller, C., Podreka, I., Deecke, L. (1988) Adult coeliac disease and brainstem encephalitis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **51**, 456-457.
- Burden, M., Mooney, P. D., Blanshard, R. J., White, W. L., Cambray – Deakin, D. R., Sanders, D. S. (2015) Cost and availability of gluten – free food in the UK: in store and online. *Postgrad. Med. J.* **91**, 622 – 626.
- Bustamante, M. A., Fenandez – Gil, M. P., Churruca, I., Miranda, J., Lasa, A., Navarro, V., Simon, E. (2017) Evolution of Gluten Content in Cereal – Based Gluten – Free Products: An Overview from 1998 to 2016. *Nutrients* (objavljeno online 03. siječnja 2017.). doi: 10.3390/nu9010021.
- Caproni, M., Antiga, E., Melani, L., Fabbri, P., The Italian Group for Cutaneous Immunopathology (2009) Guidelines for the diagnosis and treatment of dermatitis herpetiformis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **23**, 633-638.
- Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., De Vitis, I., Pianelli, G., Gesuita, R., Carle, F., Mandolesi, A., Bearzi, I., Fasano, A. (2007) A prospective, double – blind, placebo – controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 160 – 166.
- Catassi, C. (2015) Gluten Sensitivity. *Ann. Nutr. Metab.* **67**, 16 – 26.
- Chesnut, R. S., Shotwell, M. A., Boyer, S. K., Larkins, B. A. (1989) Analysis of Avenin Proteins and the Expression of Their mRNAs in Developing Oat Seeds. *Plant Cell* **1**, 913 – 924.
- Cianferoni, A. (2016) Wheat allergy: diagnosis and management. *J. Asthma Allergy* **9**, 13-25.
- Ciclitira, P. J., Ellis, H. J., Lundin, K. E. (2005) Gluten – free diet – what is toxic? *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **19**, 359 – 371.
- Codex Alimentarius (1979 rev. 2008) Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. *CODEX STAN 118-1979*.
- Colgrave, M. L., Byrne, K., Howitt, C. A. (2017) Food for thought: Selecting the right enzyme for the digestion of gluten. *Food Chem.* (objavljeno online 04.svibnja 2017.). doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.008.

Collin, P., Thorell, L., Kaukinen, K., Maki, M. (2004) The safe threshold for gluten contamination in gluten – free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of celiac disease? *Aliment. Pharmacol. Ther.* **19**, 1277 – 1283.

Comino, I., Real, A., de Lorenzo, L., Cornell, H., Lopez – Casado, M. A., Barro, F., Lorite, P., Torres, M. I., Cebolla, A., Sousa, C. (2011) Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut* **60**, 915 – 922.

Czaja – Balsa, G. (2015) Non coeliac gluten sensitivity – A new disease with gluten intolerance. *Clin. Nutr.* **34**, 189 – 194.

Čuković – Čavka, S., Crnčević Urek, M., Brinar, M., Turk, N. (2013) Celijakija u odrasloj dobi. *Medicus* **21**, 179 – 186.

Deconinck, N., Scaillon, M., Segers, V., Groswasser, J. J., Dan, B. (2006) Opsoclonus-myoclonus associated with celiac disease. *Pediatr. Neurol.* **34**, 312 – 314.

Deutsch, H. (2009) Gluten – free diet and legislation. U: *The Science of Gluten – Free Foods and Beverages* (Arendt, E. K., Dal Bello, F., ured.), Elsevier Inc., St. Paul, str. 23 – 33.

Dewar, D. H., Ciclitira, P. J. (2005) Clinical features and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology* **128**, 19 – 24.

Diaz – Amigo, C., Popping, B. (2012) Gluten and Gluten – Free: Issues and Considerations of Labeling Regulations, Detection Methods, and Assay Validation. *J. AOAC Int.* **95**, 337 – 348.

do Nascimento, A. B., Fiates, G. M., Dos Anjos, A., Teixeira, E. (2013) Analysis of ingredient lists of commercially available gluten – free and gluten – containing food products using the text mining technique. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **64**, 217 – 222.

Don, C., Koehler, P. (2014) Enzyme – Linked Immunosorbent Assays for the Detection and Quantitation of Gluten in Cereal – Based Foods. *Cereal Food. World* **59**, 171 – 178.

Elfstrom, P., Montgomery, S. M., Kampe, O., Ekbom, A., Ludvigsson, J. F. (2008) Risk of thyroid disease in individuals with celiac disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3915 – 3921.

Elli, L., Villalta, D., Roncoroni, L., Barisani, D., Ferrero, S., Pellegrini, N., Bardela, M. T., Valiante, F., Tomba, C., Carroccio, A., Bellini, M., Soncini, M., Cannizzaro, R., Leandro, G.

(2017) Nomenclature and diagnosis of gluten – related disorders: A position statement by the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO). *Dig. Liver Dis.* **49**, 138 – 146.

Farage, P., de Medeiros Nobrega, Y. K., Pratesi, R., Gandolfi, L., Assuncao, P., Zandonadi, R. P. (2017) Gluten contamination in gluten – free bakery products: a risk for celiac disease patients. *Public Health Nutr.* **20**, 413 – 416.

Farthing, M. J., Rees, L. H., Edwards, C. R., Dawson, A. M. (1983) Male gonadal function in coeliac disease: 2. Sex hormones. *Gut* **24**, 127 – 135.

Fasano, A., Catassi, C. (2001) Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Celiac Disease: An Evolving Spectrum. *Gastroenterology* **120**, 636 – 651.

Foschia, M., Horstmann, S., Arendt, E. K., Zannini, E. (2016) Nutritional therapy – Facing the gap between celiac disease and gluten – free food. *Int. J. Food Microbiol.* **19**, 113 – 124.

Franzese, A., Iannucci, M. P., Valerio, G., Ciccimarra, E., Spaziano, M., Mandato, C., Vajro, P. (2001) Atypical celiac disease presenting as obesity – related liver dysfunction. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **33**, 329 – 332.

Garcia, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H., Mendez, E. (2005) Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 529 – 539.

Gasbarrini, A., Torre, E. S., Trivellini, C., De Carolis, S., Caruso, A., Gasbarrini, G. (2000) Recurrent spontaneous abortion and intrauterine fetal growth retardation as symptoms of coeliac disease. *Lancet* **356**, 399 – 400.

Gellrich, C., Schieberle, P., Wieser, H. (2003) Biochemical characterization and quantification of the storage protein (secalin) types in rye flour. *Cereal. Chem.* **80**, 102 – 109.

Gujral, N., Freeman, H. J., Thomson, A. B. R. (2012) Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J. Gastroenterol.* **18**, 6036 – 6059.

Hadjivassiliou, M., Maki, M., Sanders, D. S., Williamson, C. A., Grunewald, R. A., Woodroffe, N. M., Korponay – Szabo, I. R. (2006) Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology* **14**, 373 – 377.

Hadjivassiliou, M., Sanders, D. S., Woodroffe, N., Williamson, C., Grunewald, R. A. (2008a) Gluten ataxia. *Cerebellum* **7**, 494 – 498.

Hadjivassiliou, M., Aeschlimann, P., Strigun, A., Sanders, D. S., Woodroffe, N., Aeschlimann, D. (2008b) Autoantibodies in gluten ataxia recognize a novel neuronal transglutaminase. *Ann. Neurol.* **64**, 332 – 343.

Hadjivassiliou, M., Sanders, D. S., Grunewald, R. A., Woodroffe, N., Boscolo, S., Aeschlimann, D. (2010) Gluten sensitivity: from gut to brain. *Lancet Neurol.* **9**, 318 – 330.

Hadjivassiliou, M., Martindale, J., Shanmugarajah, P., Grunewald, R. A., Sarrigiannis, P. G., Beauchamp, N., Garrard, K., Warburton, R., Sanders, D. S., Friend, D., Duty, S., Taylor, J., Hoggard, N. (2017) Causes of progressive cerebellar ataxia: prospective evaluation of 1500 patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **88**, 301 – 309.

HAH (2017) HACCP, HAH – Hrvatska agencija za hranu, Osijek, <<https://www.hah.hr/arhiva/haccp.php>>. Pristupljeno 07. kolovoza 2017.

Hallert, C., Grant, C., Grehn, S., Granno, C., Hulten, S., Midhagen, G., Strom, M., Svensson, H., Valdimarsson, T. (2002) Evidence of poor vitamin status in celiac patients on a gluten – free diet for 10 years. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 1333 – 1339.

Hassan, H., Elaridi, J., Bassil, M. (2017) Evaluation of gluten in gluten – free – labeled foods and assessment of exposure level to gluten among celiac patients in Lebanon. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **21**, 1 – 6.

Heikkila, K., Koskinen, O. A., Agarwal, A., Tikkinen, K. A., Maki, M., Kaukinen, K. (2015) Associations of coeliac disease with coronary heart disease and cerebrovascular disease: A systematic review and meta – analysis. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **25**, 816 – 831.

Herrero – Gonzalez, J. E. (2010) Clinical Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Dermatitis Herpetiformis. *Actas Dermosifiliogr.* **101**, 820 – 826.

HOK (2016) Vodič za označavanje nepretpakirane hrane. HOK – Hrvatska obrtnička komora, Zagreb, <[www.hok.hr/content/download/24292/226301/file/VODIČ10-6-2016.pdf](http://www.hok.hr/content/download/24292/226301/file/VODIČ10-6-2016.pdf)>. Pristupljeno 07. kolovoza 2017.

Hollon, J. R., Cureton, P. A., Martin, M. L., Puppa, E. L. L., Fasano, A. (2013) Trace gluten contamination may play a role in mucosal and clinical recovery in a subgroup of diet –

adherent non – responsive celiac disease patients. *BMC Gastroenterol.* (objavljeno *online* 23. veljače 2013.). doi: 10.1186/1471-230X-13-40.

Holm, K., Maki, M., Vuolteenaho, N., Mustalahti, K., Ashorn, M., Ruuska, T., Kaukinen, K. (2006) Oats in the treatment of childhood celiac disease: a 2 – year controlled trial and a long – term clinical follow – up study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **23**, 1463 – 1472.

Howdle, P. D. (2003) Celiac (Coeliac) Disease. U: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 2. izd., (Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M., ured.), Academic Press, London, str. 987 – 994.

Huang, W., Li, L., Wang, F., Wan, J., Tilley, M., Ren, C., Wu, S. (2010) Mixolab thermomechanical characteristics of oat. *Food Chem.* **121**, 934 – 939.

Huang, X., Kanerva, P., Salovaara, H., Sontag – Strohm, T. (2016) Degradation of C – hordein by metal – catalysed oxidation. *Food Chem.* **196**, 1256 – 1263.

Inomata, N. (2009) Wheat allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **9**, 238 – 243.

Jadrešin, O., Miška, Z., Kolaček, S., Sonicki, Z., Žižić, V. (2008) Compliance with gluten – free diet in children with coeliac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **47**, 344 – 348.

Janatuinen, E. K., Pikkarainen, P. H., Kemppainen, T. A., Kosma, V. M., Jarvinen, R. M., Uusitupa, M. I., Julkunen, R. J. (1995) A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1033 – 1037.

Janatuinen, E. K., Kemppainen, T. A., Julkunen, R. J., Kosma, V. M., Maki, M., Heikkinen, M., Uusitupa, M. I. (2002) No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* **50**, 332 – 335.

Jnawali, P., Kumar, V., Tanwar, B. (2016) Celiac disease: Overview and considerations for development of gluten – free foods. *Food Science and Human Wellness* **5**, 169 – 176.

Junker, Y., Zeissig, S., Kim, S. – J., Barisani, D., Wieser, H., Leffler, D. A., Zevallos, V., Libermann, T. A., Dillon, S., Freitag, T. L., Kelly, C. P., Schuppan, D. (2012) Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll – like receptor 4. *J. Exp. Med.* **209**, 2395 – 2408.

- Kabbani, T. A., Vanga, R. R., Leffler, D. A., Villafuerte – Galvez, J., Pallav, K., Hansen, J., Mukherjee, R., Dennis, M., Kelly, C. P. (2014) Celiac disease or non – celiac gluten sensitivity? An approach to clinical differential diagnosis. *Am. J. Gastroenterol.* **109**, 741 – 746.
- Karajeh, M. A., Hurlstone, D. P., Patel, T. M., Sanders, D. S. (2005) Chefs' knowledge of coeliac disease (compared to the public): a questionnaire survey from the United Kingdom. *Clin. Nutr.* **24**, 206 – 210.
- Kaukinen, K., Collin, P., Huhtala, H., Maki, M. (2013) Long – Term Consumption of Oats in Adult Celiac Disease Patients. *Nutrients* **5**, 4380 – 4389.
- Kelly, C. P., Feighery, C. F., Gallagher, R. B., Weir, D. G. (1990) Diagnosis and treatment of gluten – sensitive enteropathy. *Adv. Intern. Med.* **35**, 341 – 363.
- Khatkar, B. S., Bell, A. E., Schofield, J. D. (1995) The Dynamic Rheological Properties of Glutens and Gluten Sub – Fractions from Wheats of Good and Poor Bread Making Quality. *J. Cereal Sci.* **22**, 29 – 44.
- Koehler, P., Schwalb, T., Immer, U., Lacorn, M., Wehling, P., Don, C. (2013a) AACCI Approved Methods Technical Committee Report: Collaborative Study on the Immunochemical Determination of Intact Gluten Using an R5 Sandwich ELISA. . *J. Cereal Sci.* **58**, 36 – 40.
- Koehler, P., Schwalb, T., Immer, U., Lacorn, M., Wehling, P., Don, C. (2013b) AACCI Approved Methods Technical Committee Report: Collaborative Study on the Immunochemical Determination of Partially Hydrolyzed Gluten Using an R5 Competitive ELISA. . *J. Cereal Sci.* **58**, 154 – 158.
- Kreis, M., Forde, B. G., Rahman, S., Milfin, B. J., Shewry, P. R. (1985) Molecular Evolution of the Seed Storage Proteins of Barley, Rye and Wheat. *J. Mol. Biol.* **183**, 499 – 502.
- Kulai, T., Rashid, M. (2014) Assessment of Nutritional Adequacy of Packaged Gluten – free Food Products. *Can. J. Diet. Pract. Res.* **75**, 186 – 190.
- Kupper, C. (2005) Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology* **128**, 121 – 127.



Lebwohl, B., Ludvigsson, J. F., Green, P. H. (2015) Celiac disease and non – celiac gluten sensitivity. *BMJ* (objavljeno *online* 05. listopada 2015.). doi: 10.1136/bmj.h4347.

Lee, A., Newman, J. M. (2003) Celiac diet: its impact on quality of life. *J. Am. Diet. Assoc.* **103**, 1533 – 1535.

Lee, A. R., Ng, D. L., Dave, E., Ciaccio, E. J., Green, P. H. R. (2009) The effect of substituting alternative grains in the diet on the nutritional profile of the gluten – free diet. *J. Hum. Nutr. Diet.* **22**, 359 – 363.

Lerner, A., Blank, M. (2014) Hypercoagulability in celiac disease – An update. *Autoimmun. Rev.* **13**, 1138 – 1141.

Lionetti, E., Gatti, S., Pulvirenti, A., Catassi, C. (2015a) Celiac disease from a global perspective. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **29**, 365 – 379.

Lionetti, E., Leonardi, S., Franzonello, C., Mancardi, M., Ruggieri, M., Catassi, C. (2015b) Gluten Psychosis: Confirmation of a New Clinical Entity. *Nutrients* **7**, 5532 – 5539.

Londono, D. M., van't Westende, W. P. C., Goryunova, S., Salentijn, E. M. J., van den Broeck, H. C., van der Meer, I. M., Visser, R. G. F., Gilissen, L. J. W. J., Smulders, M. J. M. (2013) Avenin diversity analysis of the genus *Avena* (oat). Relevance for people with celiac disease. *J. Cereal Sci.* **58**, 170 – 177.

Lotta, N., Katri, K., Katri, L. (2016) The microbiota as a component of the celiac disease and non – celiac gluten sensitivity. *Clin. Nutr. Exp.* **6**, 17 – 24.

Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C., Leonard, J. N., Lundin, K. E., Murray, J. A., Sanders, D. S., Walker, M. M., Zingone, F., Ciacci, C. (2013) The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* **62**, 43 – 52.

Malalgoda, M., Simsek, S. (2017) Celiac disease and cereal proteins. *Food Hydrocolloid.* **68**, 108 – 113.

Matek, Z., Jungvirth – Hegeduš, M., Kolaček, S. (1999): Epidemiology of celiac disease in children in one Croatian county: the cumulative incidence over ten year period and way of clinical presentation (Part 1). *Collegium Antropol.* **23**, 621-628.

- Matricardi, P. M., Bockelbrink, A., Beyer, K., Keil, T., Niggemann, B., Gruber, C., Wahn, U., Lau, S. (2008) Primary versus secondary immunoglobulin E sensitization to soy and wheat in the Multi – Centre Allergy Study cohort. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 493 – 500.
- Meloni, A., Mandas, C., Jores, R. D., Congia, M. (2009) Prevalence of autoimmune thyroiditis in children with celiac disease and effect of gluten withdrawal. *J. Pediatr.* **155**, 51 – 55.
- Mena, M. C., Lombardia, M., Hernando, A., Mendez, E., Albar, J. P. (2012) Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. *Talanta* **91**, 33 – 40.
- Mišak, Z. (2014) Gluten u prehrani: uzrok celijakije ili nešto više. *Paediatr. Croat.* **58**. 175 – 179.
- Mitea, C., Kooy – Winkelaar, Y., van Veelen, P., de Ru, A., Drijfhout, J. W., Koning, F., Dekking, L. (2008) Fine specificity of monoclonal antibodies against celiac disease – inducing peptides in the gluteome. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**, 1057 – 1066.
- Morita, E., Matsuo, H., Mihara, S., Morimoto, K., Savage, A. W. J., Tatham, A. S. (2003) Fast Omega – Gliadin Is a Major Allergen in Wheat – Dependent Exercise – Induced Anaphylaxis. *J. Dermatol. Sci.* **33**, 99 – 104.
- Moron, B., Cebolla, A., Manyani, H., Alvarez – Maqueda, M., Megias, M., Thomas Mdel, C., Lopez, M. C., Sousa, C. (2008) Sensitive detection of cereal fraction that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 405 – 414.
- Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., Murray, L., Metzger, M. H., Gasparin, M., Bravi, E., Maki, M., Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology (2010) The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann. Med.* **42**, 587 – 595.
- Neuhausen, S. L., Steele, L., Ryan, S., Mousavi, M., Pinto, M., Osann, K. E., Flodman, P., Zone, J. J. (2008) Co – occurrence of celiac disease and other autoimmune diseases in celiacs and their first – degree relatives. *J. Autoimmun.* **31**, 160 -165.

Nwaru, B. I., Hickstein, L., Panesar, S. S., Roberts, G., Muraro, A., Sheikh, A. (2014) Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta – analysis. *Allergy* **69**, 992 – 1007.

Oliveira, O. M. V., Zandonadi, R. P., Gandolfi, L., Coutinho de Almeida, R., Almeida L. M., Pratesi, R. (2013) Evaluation of the Presence of Gluten in Beans Served an Self – Service Restaurants: A Problem for Celiac Disease Carriers. *Journal of Culinary Science and Technology* **12**, 22 – 33.

Ostblom, E., Lilja, G., Ahlstedt, S., van Hage, M., Wickman, M. (2008a) Patterns of quantitative food – specific IgE – antibodies and reported food hypersensitivity in 4 – year – old children. *Allergy* **63**, 418 – 424.

Ostblom, E., Lilja, G., Pershagen, G., van Hage, M., Wickman, M. (2008b) Phenotypes of food hypersensitivity and development of allergic diseases during the first 8 years of life. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1325 – 1332.

Oxentenko, A. S., Murray, J. A. (2003) Celiac disease and dermatitis herpetiformis: the spectrum of gluten – sensitive enteropathy. *Int. J. Dermatol.* **42**, 585 – 587.

Palosuo, K. (2003) Update on wheat hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **3**, 205 – 209.

Pellegrini, N., Agostoni, C. (2015) Nutritional aspects of gluten – free products. *J. Sci. Food Agr.* **95**, 2380 – 2385.

Pereira, A. C., Edwards, M. J., Buttery, P. C., Hawkes, C. H., Quinn, N. P., Giovannoni, G., Hadjivassiliou, M., Bhatia, K. P. (2004) Choreic syndrome and coeliac disease: a hitherto unrecognised association. *Mov. Disord.* **19**, 478 – 482.

Pietzak, M. (2012) Celiac disease, wheat allergy, and gluten sensitivity: when gluten free is not a fad. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **35**, 68S – 75S

Provedbena Uredba Komisije (EU) br. 828/2014 od 30. srpnja 2014. o zahtjevima za informiranje potrošača o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani (SL L 228, 31.7.2014., str. 5.–8.)

Pulido, O. M., Gillespie, Z., Zarkadas, M., Dubois, S., Vavasour, E., Rashid, M., Switzer, C., Godefroy, S. B. (2009) Introduction of oats in the diet of individuals with celiac disease: a systematic review. *Adv. Food Nutr. Res.* **57**, 235 – 285.

Reunala, T. L. (2001) Dermatitis herpetiformis. *Clin. Dermatol.* **19**, 728 – 736..

Rostami, K., Bold, J., Parr, A., Johnson, M. W. (2017) Gluten – Free Diet Indications, Safety, Quality, Labels, and Challenges. *Nutrients* (objavljeno online 08. kolovoza 2017.). doi: 10.3390/nu9080846

Rostom, A., Dube, C., Cranney, A., Saloojee, N., Sy, R., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., Pan, I., McNeil, J., Moher, D., Mack, D., Patel, D. (2004) Celiac disease. *Evid. Rep. Technol. Assess. (Summ.)* **104**, 1 – 6.

Rostom, A., Murray, J. A., Kagnoff, M. F. (2006) American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* **131**, 1981 – 2002.

Runje, M., Cvrtila, Ž. (2006) ELISA u analitici hrane. *Meso* **7**, 89 – 95.

Sajic, N., Oplatowska – Stachowiak, M., Streppel, L., Drijfhout, J. – W., Salden, M., Koning, F. (2017) Development and in – house validation of a competitive ELISA for the quantitative detection of gluten in food. *Food Control* **80**, 401 – 410. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.05.021.

Salmi, T. T., Hervonen, K., Kautiainen, H., Collin, P., Reunala, T. (2011) Prevalence and incidence of dermatitis herpetiformis: a 40 – year prospective study from Finland. *Br. J. Dermatol.* **165**, 354 – 359.

Salvatori, N., Reccardini, F., Convento, M., Purinan, A., Colle, R., De Carli, S., Garzoni, M., Lafiandra, D., De Carli, M. (2008) Asthma induced by inhalation of flour in adults with food allergy to wheat. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1349 – 1356.

Sanz, Y. (2015) Microbiome and Gluten. *Ann. Nutr. Metab.* **67**, 28-41.

Sapone, A., Lammers, K. M., Casolaro, V., Cammarota, M., Giuliano, M. T., De Rosa, M., Stefanile, R., Mazzarella, G., Tolone, C., Russo, M. I., Esposito, P., Ferraraccio, F., Carteni, M., Riegler, G., de Magistris, L., Fasano, A. (2011) Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten – associated conditions: celiac disease and

gluten sensitivity. *BMC Med.* (objavljeno *online* 09. ožujka 2011.). doi: 10.1186/1741-7015-9-23.

Sapone, A., Bai, J. C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P. H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D. S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C., Fasano, A. (2012) Spectrum of gluten – related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* (objavljeno *online* 07. veljače 2012.). doi: 10.1186/1741-7015-10-13.

Sardy, M., Karpati, S., Merkl, B., Paulsson, M., Smyth, N. (2002) Epidermal transglutaminase (TGase 3) in the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J. Exp. Med.* **195**, 747 – 757.

Saturni, L., Ferretti, G., Bacchetti, T. (2010) The Gluten – Free Diet: Safety and Nutritional Quality. *Nutrients* (objavljeno *online* 14. siječnja 2010.). doi: 10.3390/nu2010016.

Savage, J., Johns, C. B. (2015) Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **35**, 45 – 59.

Scherf, K. A., Koehler, P., Wieser, H. (2016) Gluten and wheat sensitivities – An overview. *J. Cereal Sci.* **67**, 2 – 11.

Scherf, K. A., Poms, R. E. (2016) Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *J. Cereal Sci.* **67**, 112 – 122.

Schultz, M., Shin, S., Coppell, K. J. (2017) Awareness of coeliac disease among chefs and cooks depends on the level and place of training. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **24**, 719 – 724.

Schumann, M., Siegmund, B., Schulzke, J. D., Fromm, M. (2017) Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 150 – 162.

See, J., Murray, J. A. (2006) Gluten – Free Diet: The Medical and Nutrition Management of Celiac Disease. *Nutr. Clin. Pract.* **21**, 1 – 15.

Sharp, K., Walker, H., Coppell, K. J. (2014) Coeliac disease and the gluten – free diet in New Zealand: The New Zealand Coeliac Health Survey. *Nutr. Diet.* **71**, 223 – 228.

Shewry, P. R., Halford, N. G. (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* **53**, 947 – 958.

Simpson, S., Lebwohl, B., Lewis, S. K., Tennyson, C. A., Sanders, D. S., Green, P. H. (2011) Awareness of gluten – related disorders: A survey of the general public, chefs and patients. *E – SPEN Eur. E. J. Clin. Nutr. Metab.* **6**, 227 – 231.

Sollid, L. M. (2002) Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 647 – 655.

Sollid, L. M., Jabri, B. (2011) Celiac disease and transglutaminase 2: a model for posttranslational modification of antigens and HLA association in the pathogenesis of autoimmune disorders. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 732 – 738.

Skerritt, J. H., Hill, A. S. (1990) Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1771 – 1778.

Starčević Čizmarević, N., Mijandrušić – Sinčić, B., Licul, V., Kapović, M., Ristić, S. (2015) Geni i celijakija. *Paediatr. Croat.* **59**, 88 – 94.

Škovierova, H., Vidomanova, E., Mahmood, S., Sopkova, J., Drgova, A., Červenova, T., Halašova, E., Lehotsky, J. (2016) The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* (objavljeno online 20. listopada 2016.). doi: 10.3390/ijms17101733.

Šubarić, D., Babić, J., Ačkar, Đ. (2012) Modificiranje škroba radi proširenja primjene. *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi*, **1**, 247 – 258.

Tanner, G. J., Colgrave, M. L., Blundell, M. J., Goswami, H. P., Howitt, C. A. (2013) Measuring hordein (gluten) in beer – a comparison of ELISA and mass spectrometry. *PLoS ONE* (objavljeno online 28. veljače 2013.). doi: 10.1371/journal.pone.0056452.

Tatham, A. S., Shewry, P. R. (2008) Allergens to wheat and related cereals. *Clin. Exp. Allergy* **38**, 1712 – 1726.

Theethira, T. G., Dennis, M. (2015) Celiac disease and the gluten – free diet: consequences and recommendations for improvement. *Dig. Dis.* **33**, 175 – 182.

- Thompson, T. (1999) Thiamin, riboflavin, and niacin contents of the gluten – free diet: is there cause for concern? *J. Am. Diet. Assoc.* **99**, 858 – 862.
- Thompson, T. (2000) Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten – free diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **100**, 1389 – 1396.
- Thompson, T., Simpson, S. (2015) A comparison of gluten levels in labeled gluten – free and certified gluten – free foods sold in the United States. *Eur. J. Clin. Nutr.* **69**, 143 – 146.
- Tjon, J. M., van Bergen, J., Koning, F. (2010) Celiac disease: how complicated can it get? *Immunogenetics* **62**, 641 – 651.
- Tye – Din, J. A., Stewart, J. A., Dromei, J. A., Beissbarth, T., van Heel, D. A., Tatham, A., Henderson, K., Mannering, S. I., Gianfrani, C., Jewell, D. P., Hill, A. V. S., McCluskey, J., Rossjohn, J., Anderson, R. P. (2010) Comprehensive, Quantitative Mapping of T Cell Epitopes in Gluten in Celiac Disease. *Sci. Transl. Med.* **2**, 41 – 51.
- Valdes, I., Garcia, E., Llorente, M., Mendez, E. (2003) Innovative approach to low – level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme – linked immunosorbent assay protocol. *Eur. J. Gastroen. Hepat.* **15**, 465 – 474.
- Valenti, S., Corica, D., Ricciardi, L., Romano, C. (2017) Gluten – related disorders: certainties, questions and doubts. *Ann. Med.* (objavljeno *online* 02. svibnja 2017.). doi: 10.1080/07853890.2017.1325968.
- van Heel, D. A., West, J. (2006) Recent advances in coeliac disease. *Gut* **55**, 1037 – 1046.
- Vierk, K. A., Koehler, K. M., Fein, S. B., Street, D. A. (2007) Prevalence of self – reported food allergy in American adults and use of food labels. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1504 – 1510.
- Volta, U., Villanacci, V. (2011) Celiac disease: diagnostic criteria in progress. *Cell. Mol. Immunol.* **8**, 96 – 102.
- Volta, U., Tovoli, F., Cicola, R., Parisi, C., Fabbri, A., Piscaglia, M., Fiorini, E., Caio, G. (2012) Serological tests in gluten sensitivity (nonceliac gluten intolerance). *J. Clin. Gastroenterol.* **46**, 680 – 685.

- Volta, U., Caio, G., Tovoli, F., De Giorgio, R. (2013) Non – celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness. *Cell. Mol. Immunol.* **10**, 383 – 392.
- Volta, U., Bardella, M. T., Calabro, A., Troncone, R., Corazza, G. R.; Study Group for Non – Celiac Gluten Sensitivity (2014) An Italian prospective multicenter survey on patients suspected of having non – celiac gluten sensitivity. *BMC Med.* (objavljeno *online* 23. svibnja 2014.). doi: 10.1186/1741-7015-12-85.
- Walsh, J., O' Flynn, N. (2011) Diagnosis and assessment of food allergy in children and young people in primary care and community settings: NICE clinical guideline. *Br. J. Gen. Pract.* **62**, 473 – 475.
- Wang, J. (2010) Management of the patient with multiple food allergies. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **10**, 271 – 277.
- Welstead, L. (2015) The Gluten – Free in the 3<sup>rd</sup> Millennium: Rules, Risks and Opportunities. *Diseases* **3**, 136 – 149.
- Wieser, H. (2007) Chemistry of gluten protein. *Food Microbiol.* **24**, 115 – 119.
- Wieser, H. (2008) Detection of gluten. U: Gluten – Free Cereal Products and Beverages (Arendt, E. K., Dal Bello, F., ured.), Academic Press, Amsterdam, str. 47 – 80.
- Wieser, H., Koehler, P. (2009) Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid? *Eur. Food Res. Technol.* **229**, 9 – 13.
- Wieser, H., Koehler, P., Konitzer, K. (2014) Celiac Disease and Gluten – Multidisciplinary Challenges and Opportunities, Academic Press Elsevier, London/Waltham/San Diego.
- Witczak, M., Ziobro, R., Juszczak, L., Korus, J. (2016) Starch and starch derivatives in gluten – free systems – A review. *J. Cereal. Sci.* **67**, 46 – 57.
- Woodward, J. (2015) Coeliac disease. *Medicine* **43**, 234 – 238.
- Worosz, M. R., Wilson, N. L. W. (2012) A Cautionary Tale of Purity, Labeling and Product Literacy in the Gluten – Free Market. *J. Consum. Aff.* **46**, 288 – 318.
- Zhao, J., Tian, Z., Chen, L. (2010). Effects of Deamidation on Structure and Functional Properties of Barley Hordein. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 11448 – 11455.



Žilić, S. M., Barać, M. B., Pešić, M. B., Mladenović Drinić, S. D., Ignjatović – Micić, D. D., Srebrić, M. B. (2011) Characterization of proteins from kernel of different soybean varieties. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 60 – 67.