

Određivanje alergena mlijeka ELISA metodom

Tišlarić, Zrinka

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:710396>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Zrinka Tišlarić

835/USH

**ODREĐIVANJE ALERGENA
MLIJEKA ELISA METODOM**

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Kseniji Marković na predloženoj temi, uloženom vremenu, stručnom vodstvu, velikoj pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala svim mojim prijateljima i dragim ljudima koji su mi najljepše godine odrastanja učinili nezaboravnima i lakšima. Hvala Vam na zajedničkim trenucima, iskustvima i razgovorima.

Najviše se zahvaljujem svojim roditeljima. Hvala Vam na beskonačnom strpljenju, razumijevanju, podršci i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE ALERGENA MLIJEKA ELISA METODOM

Zrinka Tišlarić, 835/USH

Sažetak: Tijekom ovog istraživanja, imunoenzimskom ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metodom analiziran je udio potencijalnih alergena mlijeka u 24 uzorka keksa i čajnih peciva prikupljenih iz trgovačkih lanaca i slastičarnica sa zagrebačkog tržišta, te su prikupljeni stavovi i mišljenja potrošača o mlijeku i proizvodima od mlijeka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. U 9 od 12 analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca detektirana je prisutnost alergena mlijeka pri čemu je prosječna vrijednost iznosila $0,58 \text{ mgkg}^{-1}$, a uzorci s najvišim udjelom alergena mlijeka ($0,70 \text{ mgkg}^{-1}$) nisu u okviru informacija o hrani sadržavali navod vezan uz prisutnost alergena mlijeka. Udio alergena mlijeka, detektiranih u 3 od 5 analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz slastičarnica, iznosio je prosječno $0,14 \text{ mgkg}^{-1}$ pri čemu informacije o hrani analiziranih proizvoda nisu pružale navode vezane uz prisutnost alergena mlijeka. U svih 7 analiziranih uzoraka keksa s maslacem iz trgovačkih lanaca i slastičarnica detektirani su alergeni mlijeka, pri čemu su niži udjeli određeni u uzorcima keksa s maslacem iz trgovačkih lanaca. 62,2 % ispitanika smatra kako keksi ili čajna peciva ne sadrže tragove mlijeka ukoliko na deklaraciji takovih proizvoda nema navoda o mogućoj prisutnosti mlijeka. Od 24 ukupno analizirana uzorka, ELISA metodom su alergeni mlijeka detektirani u 6 uzoraka bez navoda vezanih uz prisutnost alergena mlijeka u okviru informacija o hrani.

Ključne riječi: alergeni mlijeka, ELISA, informacija o hrani

Rad sadrži: 45 stranica, 14 slika, 6 tablica, 62 literaturna navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 27. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF MILK ALLERGENS BY ELISA METHOD

Zrinka Tišlarić, 835/USH

Abstract: During this study, the content of potential milk allergens in 24 samples of biscuits and tea biscuits collected from supermarkets and pastry shops on Zagreb market was analysed by ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) method, and also the consumers opinion on milk and milk products as substances or products that caused allergies was examined. The presence of milk allergens was detected in 9 out of 12 analysed samples of biscuits and tea biscuits from supermarkets, with an average value of $0,58 \text{ mgkg}^{-1}$, and food informations of samples with the highest value of milk allergens ($0,70 \text{ mgkg}^{-1}$) were not included advisory label related to the presence of milk allergens. The average content of milk allergens, detected in 3 of the 5 analysed samples of biscuits and tea biscuits from pastry shops, was $0,14 \text{ mgkg}^{-1}$, where the food information of the analysed products did not provide any indication of the presence of milk allergens. In all 7 analysed samples of butter biscuits from supermarkets and pastry shops, milk allergens were detected, with lower contents being determined in the samples from supermarkets. 62,2% of respondents consider that biscuits or tea biscuits do not contain traces of milk if declarations of products not provide informations of possible presence of milk. Among 24 analysed samples, by the ELISA method, milk allergens were detected in 6 samples without advisory label related to the presence of milk allergens within food information.

Keywords: milk allergens, ELISA, food information

Thesis contains: 45 pages, 14 figures, 6 tables, 62 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Ksenija Marković, Associate professor

Reviewers:

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

Thesis defended: 27 September 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Alergija na hranu	2
2.1.1. Kemijski sastav alergena i njihov utjecaj na organizam.....	3
2.2. Alergeni mlijeka	5
2.2.1. Simptomi alergijske reakcije na mlijeko	7
2.2.2. Križne reakcije	7
2.2.3. Prevencija i terapija	8
2.3. Metode određivanja alergena mlijeka	9
2.4. ELISA metoda.....	10
2.5. Zakonska regulativa	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJAL.....	16
3.1.1. Uzorci	16
3.1.2. Ispitanici	16
3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor.....	16
3.1.4. Reagensi	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Priprema reakcijskih otopina.....	19
3.2.2. Ekstrakcija uzoraka	19
3.2.3. ELISA test	19
3.2.3.1. Princip testa	19
3.2.3.2. Postupak određivanja	20
3.2.4. Ispitivanje stavova potrošača o alergenima mlijeka i proizvodima koji uzrokuju alergije .	22
3.2.5. Obrada podataka.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Udio potencijalnih alergena mlijeka određen ELISA testom u uzorcima keksa i čajnih peciva	23
4.2. Percepcija potrošača o mlijeku i proizvodima od mlijeka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije.....	31
5. ZAKLJUČCI.....	38
6. LITERATURA.....	39
7. PRILOZI.....	46

1. UVOD

Alergija na hranu je jedna od raširenih bolesti današnjice. Posljednjih deset godina ova bolest je u porastu, osobito u razvijenim zemljama Zapada. Između 11 i 26 milijuna ljudi na području Europe boluje od alergije na hranu. Učestalost pojavljivanja je viša u djece (5-8%) nego u odraslih (1-3%) (Turkalj i Mrkić, 2012).

Kravlje mlijeko sadrži brojne proteinske komponente od kojih svaka može izazvati senzibilizaciju (Isolauri, 1997). Kazeini čine 80% proteina mlijeka dok 10% čine proteini sirutke gdje dominira β -laktoglobulin. Najugroženija populacija ovom alergijom su djeca i alergija na kravlje mlijeko često je prva glavna alergija koja se manifestira, budući da su proteini kravljeg mlijeka prvi izvor antigena sa kojima se djeca susreću u velikim količinama. Većina djece (85-90%) preraste ovu alergiju u dobi od 3 godine. Postotak alergije u odrasle dobi je 0,5% (Hochwallner i sur., 2014).

Najveći problem predisponiranim pojedincima predstavljaju skriveni mliječni alergeni u proizvodima kao što su kobasice, keksi, gotova jela, pića, obzirom da već i niske koncentracije mlijeka mogu dovesti do alergijskih reakcija pa čak i do anafilaksije.

ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metoda je jedna od imunoenzimskih metoda koja se koristi za detekciju alergena, a bazira se na specifičnom vezanju antitijela i antigena (na primjer alergeni mlijeka).

Cilj ovog rada bit će odrediti udio potencijalnih alergena mlijeka u dvadeset i četiri uzorka keksa i čajnih peciva pomoću ELISA metode te prikupiti stavove i mišljenja potrošača o mlijeku i proizvodima od mlijeka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Alergija na hranu

Alergenima u hrani podliježe 3-4% opće populacije te 6% dojenčadi i djece pri čemu alergija na hranu postaje sve veći javnozdravstveni problem za sigurnost djece i ljudi koji podliježu alergijskim reakcijama (Sicherer i Sampson, 2010).

Sama nutritivna alergija predstavlja hipersenzitivnu reakciju imunološkog sustava organizma na unijete tvari (antigene) koji potječu iz hrane, a organizam ih sam po sebi smatra stranim tvarima.

Ljudski organizam tijekom života dolazi u dodir s mnoštvom različitih proteina putem hrane i svaki od njih je potencijalni alergen. Najčešći alergeni u hrani su proteini, a hrana koja predstavlja najčešći uzrok je:

1. kravlje mlijeko i mliječni proizvodi
2. jaja i proizvodi od jaja
3. morska riba i proizvodi od ribe
4. rakovi i školjke i proizvodi od njih
5. žitarice i proizvodi od žitarica
6. soja i proizvodi od soje
7. kikiriki i proizvodi od kikirikija
8. orašasti plodovi (orasi, bademi, lješnjak) i proizvodi od orašastih plodova
9. povrće: rajčica, špinat, mrkva, peršin, celer, luk
10. voće: jagode, banane, kivi, ananas, grejp (Bošnjir i sur., 2009).

Također je u porastu i broj slučajeva alergija na: crveno meso i meso peradi, žitarice (rižu koja je inače zamjenska hrana za alergične osobe), povrće (špinat, blitvu, zelje, celer, mrkvu i peršin), voće (marelicu, breskvu, lubenicu, grožđe, šljivu, kruške, jabuke), riječnu ribu, kakao i kavu (Bošnjir i sur., 2009). Sama dijagnoza alergije na hranu je komplicirana zbog mnoštva različitih simptoma i povezanosti s mnogim drugim bolestima. Trenutno se oboljele usmjerava da izbjegavaju konzumiranje hrane koja sadrži ili može sadržavati alergene te ukoliko dođe do kontakta s takvom hranom, potrebno je liječiti simptome (Gomaa i Boye, 2015).

Skriveni alergeni u hrani predstavljaju sve veći zdravstveni problem za osobe koje imaju nutritivnu alergiju. Tvar je skriveni alergen kada je nepoznata ili nije deklarirana na informaciji o hrani danog proizvoda. Ovi propusti nisu uvijek namjerni te postoji mnogo

načina da alergeni budu skriveni u hrani: križna kontaminacija uslijed korištenja iste opreme za proizvodnju koja sadrži alergen i proizvod koji ne sadrži alergen, križna kontaminacija tijekom procesiranja hrane, nepažnja u proizvodnji i deklariranju, promjena sastojaka u recepturi bez navoda, nerazumijevanje deklaracije na proizvodu. Skriveni alergeni mogu izazvati širok raspon reakcija preosjetljivosti (Anibarro i sur., 2007).

2.1.1. Kemijski sastav alergena i njihov utjecaj na organizam

Po kemijskom sastavu, nutritivni alergeni su proteini mase iznad 100.000 Da ili tvari vezane na proteine (hapteni) i upravo zbog toga povećava se mogućnost da svaka namirnica može postati alergen. Osim toga proteini, polisaharidi ili lipidi vezani na haptene različite su snage. Jači su alergeni proteina i polisaharida nego lipida (Čvorišćec i sur., 2001). Svaki protein koji izaziva reakciju može imati više strukturnih aktivnih mjesta ili konformacijskih epitopa koji djeluju u interakciji s imunološkim sustavom tijela. Ti epitopi izazivaju alergijske reakcije posredovane imunoglobulinom E (IgE) kod osjetljivih pojedinaca koji nose IgE antitijela koja specifično prepoznaju jedinstvenu strukturu pojedinačnih epitopa. IgE se nalazi u tkivima probavnog sustava vezanom na površinu mastocita, bazofila ili aktiviranih eozinofila. Kada alergeni hrane prođu kroz sluznice u probavni sustav i dođu do tih specifičnih IgE antitijela, njihovi epitopi vežu se i povezuju na IgE protutijela vezana na površinu koji tada pokreću medijatore kao što su histamin, leukotrieni i prostaglandini koji se oslobađaju iz mastocita. Ovi posrednici potom izazivaju neposrednu reakciju preosjetljivosti koja se očituje vazodilatacijom, kontrakcijom glatkih mišića i drugim upalnim promjenama u normalnoj fiziologiji. Promjene struktura epitopa utječu na promjene vezanja IgE antitijela. Stoga, na imunoreaktivna ili alergijska svojstva proteina i peptida utječe struktura trodimenzionalnih konformacijskih epitopa i potencijalno stvaranje novih konformacijskih epitopa uslijed različitih uvjeta prerade/kuhanja (Ward, 2015).

Coombs i Gell-u su davne 1975. godine ustanovili da postoje 4 tipa alergijskih reakcija: tip I, II, III i IV. Prva tri tipa reakcija nazvane su reakcijama preosjetljivosti i uzrokovane su antitijelima koje imunološki sustav organizma počinje proizvoditi u slučaju doticaja s antigenom. Reakcija tipa IV nazvana je reakcijom kasne/odgođene preosjetljivosti i uzrokovana je TH1-limfocitima. Najčešći tip reakcija na hranu je tip I, posredovana IgE-antitijelima. Također se reakcije u organizmu mogu podijeliti na one koje su posredovane IgE, zatim IgE-neposredovane te miješane reakcije: IgE-posredovane i IgE-neposredovane.

Reakcije posredovane IgE javljaju se unutar minute do 2 sata nakon unosa hrane, a najčešće se javljaju u djece. Simptomi se manifestiraju na koži, gornjim i donjim dišnim putevima, probavnom sustavu te srčanožilnom sustavu. IgE-neposredovane reakcije su one u kojima je odgođena pojava nakon unosa hrane. Vremenski se simptomi pojavljuju nakon 2 sata, a čak može i proći nekoliko dana do pojave prvih simptoma. Najčešće se pojavljuju na koži ili u probavnom sustavu poput opstipacije, kasne dijareje. Ove reakcije se u pravilu ne definiraju kao alergijske reakcije već kao intolerancije (nepodnošenje) određene tvari u hrani (poput laktoze zbog nedostatka enzima laktaze) i vrlo je važno razlikovati ta dva općenita pojma: intolerancija i alergija na hranu (Novak i sur., 2016).

Višestruki su razlozi nastanka alergijskih reakcija, a kao najvažniji čimbenici u studijama navode se ovi čimbenici: utjecaj suvremenog života i načina rada, industrijska proizvodnja, uvođenje novih tehnologija i proizvodnja hrane koje dovode do promjena u prirodnom okolišu i doprinose razvoju alergija (Kanceljak-Macan i Macan, 2000). Osim navedenih čimbenika, također je važno naglasiti i utjecaj genetskih čimbenika na pojavnost alergijskih reakcija, ukoliko osoba ima genetsku predispoziciju (pri tome se misli da ta osoba ima povećanu sintezu ukupnog i specifičnog IgE-antitijela). U studiji Buttriss iz 2001 godine, navedeno je da ako su oba roditelji alergičari, 80% je vjerojatnost da će i djeca biti alergičari. Ako je samo jedan roditelj alergičar, vjerojatnost pada na 25% (Buttriss, 2001).

U radu Sicherer i Sampson (2014) opisan je napredak oralnih, sublingvalnih i epikutanih imunoterapija za hranu, kao i niz pristupa pri napretku imunološkog modela. Alergenski specifični imunoterapeutski pristupi ne uključuju samo oralnu, sublingvalnu ili epikutanu imunoterapiju s cijelim alergenom nego i imunoterapiju s modificiranim proteinima koji su dizajnirani da budu hipoalergijski kako bi se smanjio rizik od reakcija. U pilot- istraživanju rekombinantne imunoterapije s alergenima kikirikija (Ara h 1, 2 i 3) koju eksprimira *Escherichia coli*, došlo je do čestih alergijskih reakcija pa je bilo potrebno redizajnirati istraživanje u smislu doziranja alergena ili proizvoda. Istraženi su također i kombinirajući pristupi kao što je uporaba alergenske oralne imunoterapije, a također i liječenje anti-IgE antitijelima (Wood i sur., 2013).

2.2. Alergeni mlijeka

Kravlje mlijeko je treći najčešći nutritivni alergen, odmah nakon kikirikija i orašastih plodova. Alergija na kravlje mlijeko zahvaća sve dobne skupine, ali je vodeći alergen kod dojenčadi i djece. Sadrži u prosjeku 32,7 grama po kilogramu proteina pa je stoga broj proteina (tablica 1) koji mogu uzrokovati alergijsku reakciju vrlo visok (Božanić i sur., 2010). Mlijeko sadrži dvadeset proteinskih antigenskih komponenti (tablica 1), a svaka od njih pojedinačno ili više njih zajedno mogu izazvati alergijsku reakciju. Najznačajniji proteini koji predstavljaju potencijalne alergene iz mlijeka su kazein te beta-laktoglobulin i alfa-laktoalbumin (Martinić, 2004). Postoji samo nekoliko istraživanja koja opisuju alergije na proteine sirutke poput imunoglobulina, albumina goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin*; BSA)BSA ili laktoferina (Restani i sur., 2009).

Kazein se sastoji od hidrofobne jezgre koja je okružena hidrofilnim slojem s fosforiliranim mjestima. Kako još točno nije razjašnjena trodimenzionalna struktura kazeina, pretpostavlja se da su prisutni linearni epitopi. Nasuprot kazeinu, laktoglobulin i laktalbumin su najbrojniji proteini sirutke te dolaze u obliku globularne konformacije na koje su vezani epitopi. Oba epitopa mogu uzrokovati alergijske reakcije (Monaci i sur., 2011).

Reakcija na proteine iz mlijeka (kravlje, kozje) u ljudskom organizmu uključuje imunološku reakciju posredovanu IgE-antitijelom. Mlijeko je vodeći alergen kod dojenčadi (oko 1% odrasle populacije i oko 2-3% djece). Kako su proteini mlijeka prvi strani proteini s kojima se organizam dojenčadi susreće, logično je da su upravo oni najviše izloženi eventualnom razvoju alergije na mlijeko. Djeca s godinama prerastu ovu alergiju, ali je moguće da simptomi budu prisutni sve do predškolskog uzrasta. Preosjetljivost na mlijeko često nije trajni poremećaj (Monaci i sur., 2006).

Tablica 1. Proteini mlijeka i njihov odnos u 35g^L⁻¹ mlijeka (Fiocchi i sur., 2010)

Frakcije	Protein	Naziv alergena	Masa proteina u		Molekulska masa [kDa]
			mlijeku [g ^L ⁻¹]	% proteina	
KAZEIN		<i>Bos d 8</i>	30	80	
	α_{s1} -kazein	<i>Bos d 9</i>	12-15	29	23,6
	α_{s2} -kazein	<i>Bos d 10</i>	3-4	8	25,2
	β -kazein	<i>Bos d 11</i>	9-11	27	24,0
	γ_1 -kazein				20,6
	γ_2 -kazein		1-2	6	11,8
	γ_3 -kazein				11,6
	κ -kazein	<i>Bos d 12</i>	3-4	10	19,0
PROTEINI SIRUTKE			5	20	
	alfa-laktalbumin	<i>Bos d 4</i>	1-1,5	5	14,2
	beta-laktoglobulin	<i>Bos d 5</i>	3-4	10	18,3
	imunoglobulin	<i>Bos d 7</i>	0,6-1,0	3	160,0
	BSA	<i>Bos d 6</i>	0,1-0,4	1	67,0
	laktoferin	-	0,009	Tragovi	800,0

2.2.1. Simptomi alergijske reakcije na mlijeko

Klinički simptomi alergije na mlijeko mogu biti uzrokovani različitim mehanizmima. Mehanizmi neposrednih i IgE mehanizama povezani su sa oko 60% nuspojava izazvanih kravljim mlijekom. Oni mogu utjecati na jedan ili više organa. Tipični simptomi povezani s IgE posredovanim reakcijama pojavljuju se odmah ili unutar 1-2 sata nakon ingestije i utječu na kožu, dišni sustav, probavni sustav i/ili se pojavljuju kao sustavne anafilaktičke reakcije u teškim slučajevima (Kattan i sur., 2011). IgE posredovane reakcije koje utječu na kožu uključuju urtikariju, angioedem, svrbež, osip i ispiranje. Atopijski dermatitis obično je posredovan T stanicama, ali aktivacija T stanica može biti omogućena pomoću IgE-posredovanih reakcija. Simptomi dišnog sustava koji se pojavljuju neposredno nakon unosa alergena su nosni konjuktivitis, teško disanje, kašalj, astma i edem (Du Toit i sur., 2010). Akutni simptomi unutar probavnog sustava uključuju svrbež, bol u trbuhu, mučninu, povraćanje i proljev. Alergeni mlijeka su treća najčešća komponenta hrane nakon kikirikija i orašastih plodova koji uzrokuju anafilaktičke reakcije, što čini 10-19% svih anafilaktičkih slučajeva uzrokovanih hranom (Bock i sur., 2007) sa srčanožilnim kolapsom, sinkopijom ili inkontinencijom kao najtežim obilježjima (Fiocchi i sur., 2010).

Liječenje simptoma alergije na mlijeko uključuje i upotrebu oralnih antihistaminika za blage kožne ili probavne reakcije te epinefrin autoinjektor u slučaju sustavnih ili respiratornih reakcija. Drugi nespecifični tretmani uključuju upotrebu monoklonalnih anti-IgE antitijela koja pomažu u smanjenju slobodnih IgE antitijela u krvi alergijskih bolesnika. To dovodi do smanjenja aktiviranja bazofila i povećane doze praga tolerancije. Nadalje, primjena prebiotika koji favoriziraju kolonizaciju probavnog sustava testirana je kod osoba alergičnih na mlijeko. Ipak, njihov blagotvorni učinak još uvijek nije dokazan (Hochwallner i sur., 2014).

2.2.2. Križne reakcije

Kada dva ili više alergena imaju iste ili vrlo slične epitope, nastaju križne reakcije što dovodi do vezanja istih IgE protutijela. Zbog toga osobe koje su senzibilizirane na jedan alergen, mogu reagirati i na drugi, a da prije nisu s njime došle u kontakt. Senzibilizirani organizam posjeduje specifična IgE protutijela koja se mogu povezati s više različitih alergena prepoznajući slične trodimenzionalne strukture njihovih epitopa (Brandtzaeg, 2011).

Istraživanja su pokazala značajnu krosreaktivnost kravljeg mlijeka (proteina) s nekim drugim namirnicama, kao što su proteini kozjeg ili ovčjeg mlijeka. (Lockey i sur., 2004). Nadalje,

pokazalo se da čak 50% osoba alergičnih na kravlje mlijeko je ujedno alergično na kozje mlijeko, odnosno da osobe koje su alergične na jednu vrstu mliječnog proteina će biti alergične i na druge vrste. Razlog tome su različiti sadržaji proteina u različitim vrstama mlijeka. Osim krosreaktivnosti s kozjim mlijekom, dokazano je isto tako da se kod oko 50% osoba koje su zbog alergije na kravlje mlijeko uzimale sojino mlijeko, razvila osjetljivost i na soju (El-Agamy, 2007).

2.2.3. Prevencija i terapija

Prevencija i terapija je često eliminacijska dijeta, odnosno iz prehrane se izbacuje kravlje mlijeko, a pri kupovanju hrane (osobito proizvoda od soje, budući da im se dodaju mliječni proteini kako bi se povećao udio i kvaliteta bjelančevina) važno je provjeriti sadrži li hrana proteine iz mlijeka. Odbacivanje mlijeka i hrane koja sadrži proteine mlijeka smatra se najboljim rješenjem za sprječavanje alergije. Ostalu hranu poput kruha i pekarskih proizvoda, kuhanog tijesta, riže, žitarica, griza, krumpira i kolača potrebno je pripremati bez mlijeka (Taylor i Hefle, 2006). Kako mlijeko sadrži mnoštvo nutritivno važnih komponenti za naš organizam, pogotovo kalcij, potrebno je primijeniti posebnu dijetu, koja će osigurati sve hranjive tvari, osobito kalcij, važne za pravilan rast i razvoj, a koje se najvećim dijelom unose upravo ovom hranom. Zamjena za mlijeko može biti kalcijem obogaćeno sojino mlijeko, a kalcij treba nadomjestiti i drugom hranom poput povrća (lisnato tamnozeleno povrće, cvjetača, kelj, brokula, prokulica, kelj pupčar, repa, artičoka, šparoga, tikvica), suhih leguminoza (sve vrste graha, grašak, leća), voća (naranča, suhe smokve i grožđe, bademi, orasi), sitne ribe koja se jede s kostima, račića i kozica, mineralne i izvorske vode, žitarica obogaćenih kalcijem, voćnih sokova, proizvoda od soje i druge obogaćene hrane (Bošnjir i sur., 2009).

Buttriss (2001) navodi kako osobe s alergijom na mlijeko ne bi smjele konzumirati ni svježi kravlji sir, jogurt, kiselo i slatko vrhnje, sladoled ili ostale mliječne proizvode. Pasteriziranjem mlijeka ne smanjuje se njegova alergogenost, a neki rezultati sugeriraju čak i moguće povećanje alergogenosti.

2.3. Metode određivanja alergena mlijeka

Danas postoji nekoliko metoda određivanja potencijalnih alergena u hrani. Metode koje se upotrebljavaju, usmjerene su na ciljanje samog alergena (proteina) ili na marker koji ukazuje na prisutnost alergena. Idealni marker bio bi taj isti alergen, ali detektiranje alergena samo po sebi nije uvijek izvedivo jer kemijska svojstva možda nisu dobro okarakterizirana ili postoji ograničenost korištene metode. Osim toga, hrana koja izaziva alergije može sadržavati više alergena. Marker koji se koriste za određivanje prisutnosti potencijalnih alergena u hrani ili sastojaka, su ili ciljani specifični proteini ili fragmenti DNA (Poms i sur., 2004). Metode temeljene na određivanju proteina obično uključuju imunokemijske reakcije kao što su RAST (engl. *Radio-Allergosorbent Test*), RIE (engl. *Rocket Immuno-electrophoresis*), EAST (engl. *Enzyme Allergosorbent Test*), imunoblotting metoda, ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), RIA (engl. *Radio-Immunoassay*) (Van Hengel, 2007). Imunotestovi koriste antitijela za otkrivanje specifičnih alergenskih proteina koji služe kao markeri za hranu koja izaziva alergije. Ta antitijela mogu biti monoklonalna ili poliklonalna. Monoklonalna antitijela su dobro prilagođena jer prepoznaju samo jedan epitop specifičnog antigena (Monaci i Visconti, 2010).

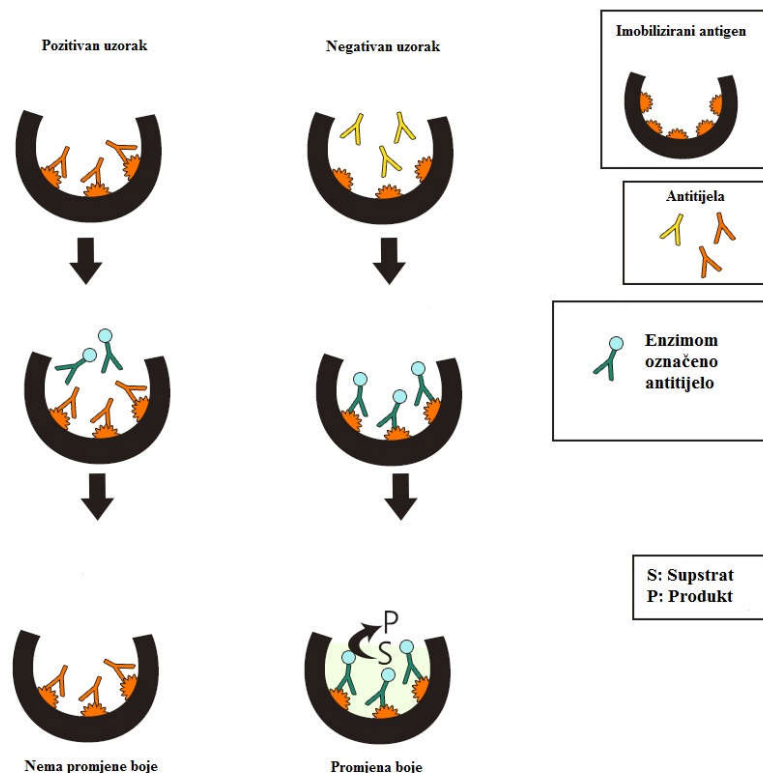
Metode koje koriste DNA obično se temelje na amplifikaciji specifičnog fragmenta DNA lančanom reakcijom polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*). Izbor metode uglavnom ovisi o hrani ili alergenu (dostupnost specifičnih antitijela/DNA i postignutog ograničenja detekcije), te načinu prerade i same proizvodnje hrane. Navedene metode imaju svoje prednosti i nedostatke u pogledu njihove primjenjivosti u detekciji i kvantifikaciji alergena u raznim prehrambenim proizvodima. *Real time* PCR, koja se koristi za određivanje alergena, omogućuje dobivanje točnijih rezultata, ali je i puno skuplja od prethodno navedenih, a koristi se i PCR u kombinaciji s ELISA testom. Biosenzori se također koriste u okviru tehnika i metoda pri određivanju alergena, a prednost takovih metoda je ta što daju rezultate u kratkom vremenskom periodu s visokim stupnjem automatizacije (Poms i sur., 2004).

Tehnike koje uključuju masenu spektrometriju sve više se istražuju u okviru određivanja alergena. Pri tome se u kombinaciji sa tekućinskom kromatografijom postiže visoka specifičnost te vrlo lako identificira protein ili peptid koji potječe iz hrane koja sadrži alergene. Metoda je uspješno primijenjena u detektiranju alergena kikirikija i alergena mlijeka u kompleksnim uzorcima hrane. Unatoč tome što se radi o skupoj i specijaliziranoj opremi, metode bazirane na masenoj spektrometriji, uz navedenu specifičnost, osiguravaju detektiranje nepovezanih alergena u uzorcima hrane (Weber i sur., 2006).

2.4. ELISA metoda

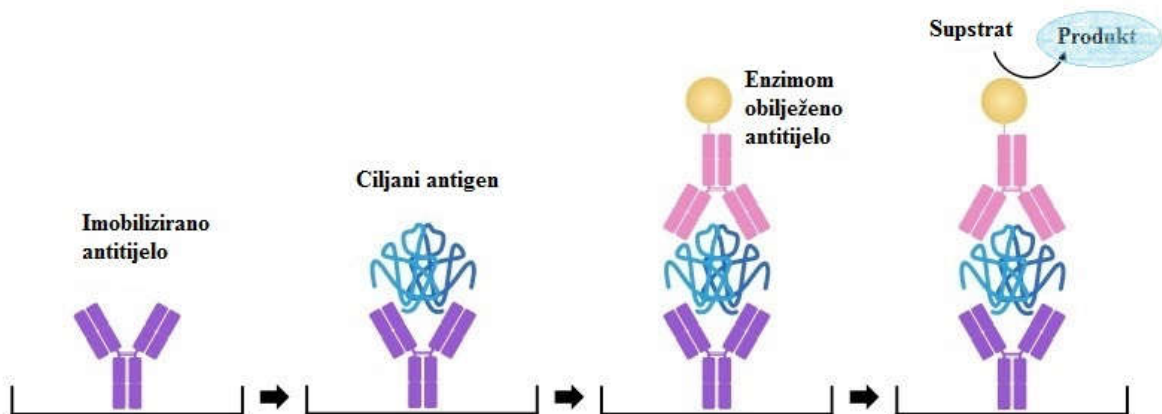
ELISA metoda je najčešće korištena metoda u laboratorijima prehrambene industrije i službenim agencijama za kontrolu hrane za detektiranje i kvantificiranje skrivenih alergena u hrani (Mohammed i sur., 2000). ELISA testovima mogu se otkriti alergeni ili specifični markeri proteini kolorimetrijskom reakcijom nakon vezanja sa specifičnim antitijelima obilježenim enzimima. Koncentracija ovog kompleksa antigena/antitijela može se naknadno procijeniti na temelju standardne krivulje koja se dobiva pročišćenim referentnim standardima. Za kvantifikaciju alergena ili proteina potencijalne hrane koja može izazvati alergijsku reakciju, koriste se najčešće dva tipa ELISA testa i to konkurentna ELISA i „sendvič“ ELISA.

Konkurentna ELISA (slika 1) uključuje imobilizirane antigene vezane za čvrstu fazu. Ako nema prisutnog antigena, antitijelo obilježeno enzimom pokazuje maksimalno vezanje na antigen vezan na čvrstoj fazi, što rezultira visokom apsorpcijom nastalog obojenog produkta. Vezanje antitijela obilježenih enzimom inhibira se povećanjem količine antigena. Standardna krivulja pokazuje tipični sigmoidalni oblik.



Slika 1. Princip konkurentne ELISA metode (Anonymous 1)

„Sendvič“ ELISA (slika 2) uključuje imobilizirano antitijelo za hvatanje na podlozi. Nakon dodavanja otopine standarda ili otopine uzorka, dolazi do vezanja antitijela-analita. Zatim se dodaje drugo, analitički specifično obilježeno antitijelo koje se također veže na analit, formirajući "sendvič". Na kraju se dodaje supstrat koji reagira s enzimom i proizvodi produkt u boji. Apsorpcija je izravno proporcionalna koncentraciji analita (Besler i sur., 2002).



Slika 2. Princip „sendvič“ ELISA metode (Anonymous 2)

Na sposobnost ELISA metode za otkrivanje alergenskog proteina hrane u ispitivanom uzorku utječe učinkovita ekstrakcija proteina iz uzorka kao i učinkovitost kojom antitijelo ili antitijela, koja se koriste u ELISA testu, detektiraju te proteine u ekstraktu uzorka. Ukupna učinkovitost ELISA metode pri detektiranju alergena hrane je funkcija ovih dvaju parametara. Činjenica je da alergične osobe često reagiraju na različite sastojke alergena/proteina hrane te se time dodatno otežava izbor metode. Budući da se većina prehrambenih proizvoda toplinski obrađuje, procesi proizvodnje hrane poput prženja i ekstruzije mogu imati značajan utjecaj na topljivost i ekstrakciju ciljanih proteina, kao i na sposobnost antitijela ili antitijela koja se koriste u ELISA testu da ih prepoznaju. Čimbenici koji mogu utjecati na rezultate ispitivanja uključuju: (1) interakcije sa spojevima u uzorku hrane (npr. polifenoli i tanini); (2) smanjena topljivost i reaktivnost toplinski denaturiranih proteina; i (3) razlike u proteinskom profilu određenog alergena hrane iz različitih vrsta, sorti i zemljopisnog podrijetla. Ti čimbenici pridonose poteškoćama u pronalaženju odgovarajućih referentnih materijala za alergene hrane i objašnjavaju zašto se proteini u ekstraktu uzorka ne mogu potpuno usporediti s onima kod kalibracije uključenih u određenu metodu detekcije (Abbott i sur., 2010).

2.5. Zakonska regulativa

Osobe koje imaju nutritivnu alergiju moraju posebno prilagoditi svoju prehranu i pripaziti na odabir proizvoda. Kako je mlijeko sveprisutno u većini proizvoda u različitim oblicima, vrlo je važno da osobe alergične na mlijeko proučavaju deklaracije na proizvodima. Kada se utvrdi da su alergeni prisutni u hrani, ali nisu deklarirani na popisu sastojaka prehrambenih proizvoda, to može predstavljati značajan rizik za osjetljive potrošače. Prema EU 178/2002 Opći zakon o hrani zahtijeva da se, ukoliko se smatra da postoji rizična hrana za potrošače koja šteti zdravlju ili sigurnosti, treba poduzeti radnje da se takva hrana ukloni s tržišta (Zakon, 2013). Posljednjih desetak godina povećava se broj incidenata povezanih s detektiranim alergenima u hrani, i to od 2004. godine kada je započelo obvezno deklariranje alergena na pakiranju bez obzira na prisutnost u recepturi (Ward, 2015).

Ulaskom Republike Hrvatske u Europsku uniju, Zakon o hrani (Zakon, 2013), koji je sukladan Uredbi (EU) br.178/2002, postaje obavezujući. Tim Zakonom definirani su termini i izrazi te navedene obaveze subjekta u poslovanju hranom vezane uz deklaracije i označavanje hrane.

Također u Hrvatskoj se od 13. prosinca 2014. obavezno primjenjuje Uredba (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani. Cilj te Uredbe bio je pojednostaviti postojeće propise o označavanju hrane radi jedinstvene primjene te omogućiti izbor hrane koji odgovara prehrambenim potrebama pojedinaca. Informacije o hrani podrazumijevaju one informacije koje se odnose na hranu, a dostupne su krajnjem potrošaču putem etiketa, drugog popratnog materijala ili na bilo koji drugi način, uključujući sredstva moderne tehnologije ili verbalne komunikacije (Pravilnik, 2014). Vrlo je važno označavanje hrane jer mora točno informirati potrošače o hrani koju konzumiraju te tako zaštititi njihovo zdravlje i interese. Ono mora u potpunosti informirati potrošače o hrani koju konzumiraju te zaštititi njihovo zdravlje i interese. Stoga je područje hrane i njezino označavanje jedno od najsloženijih zakonski uređenih područja gdje dolazi do komunikacije između subjekta u poslovanju s hranom i potrošača.

Obavezno je označavanje alergena u popisu sastojaka i potrebno je dodatno naglasiti uporabom vrsta pisma koje se razlikuje od vrste pisma ostalih sastojaka, na primjer slovima, stilovima ili bojama u pozadini ili navesti rečenicu „Sadrži alergene:“ i nabrojati ih. Obavezno je označavanje sljedećih alergena: 1. žitarice koje sadrže gluten (pšenica, raž, ječam, zob, pir, kamut ili njihovi hibridi) i proizvodi žitarica; 2. rakovi i proizvodi od rakova; 3. školjkaši i ostali mekušci te proizvodi od njih; 4. jaja i proizvodi od jaja; 5. proizvodi ribarstva; 6.

kikiriki i proizvodi od kikirikija; 7. soja i proizvodi od soje; 8. mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući i laktozu); 9. orašasti plodovi (badem *Amygdalus communis L.*, lješnjak *Corylus avellana*, orah *Juglans regia*, indijski oraščić-kešu *Anacardium occidentale*, pekan oraščić *Carya illinoensis*, brazilski oraščić *Bertholletia excelsa*, pistacija *Pistacia vera*, makadamija oraščić *Macadamia ternifolia*) i njihovi proizvodi; 10. celer i proizvodi od celera; 11. gorušica i proizvodi od gorušice; 12. lupina i proizvodi od lupine (Pravilnik, 2014).

Kada se radi o nenamjernoj prisutnosti tvari u hrani ili proizvodu koji uzrokuje alergije ili intoleranciju te koja se mogla dogoditi radi križne kontaminacije, većina subjekata u poslovanju s hranom iz predostrožnosti navodi/upozorava na nenamjernu prisutnost alergena kako bi informirali potrošače. Na tržištu se koristi jako puno različitih izraza poput: "Sadrži tragove [alergen] ", "Može sadržavati [alergen] ", "Proizvedeno na proizvodnoj liniji gdje i [alergen] ", "Proizvodi se u tvornici koja također koristi [alergen]". Potrošači se ovakvim označavanjem često dovode u zabludu ima li u proizvodu alergena ili nema, a također pokazuje i nemogućnost kontrole tehnoloških procesa i lošu proizvođačku praksu u proizvodnji i skladištu. Potrošači često i ignoriraju takve poruke, a različiti izrazi mogu se pogrešno protumačiti obzirom na različite razine rizika. Kao posljedica, izbor za kupca se nepotrebno ograničava ili su potrošači izloženi riziku ako odluče zanemariti upozorenja (Zurzolo i sur., 2013).

Često se na proizvodima vidi oznaka "Bez alergena" (eng. "Free from") koja izričito negira postojanje nekog alergena. Oznaka je upitna i opasna jer obmanjuje potrošača da alergenoj sastojka nema, dok u analitičkom smislu to može značiti da se količina ne može detektirati postojećim analizama i metodama (NZJZ Split, 2017).

Europska unija (EU) ima jedan od najviših standarda sigurnosti hrane u svijetu i to zahvaljujući čvrstom stupu zakonodavstva EU-a koji osigurava sigurnu hranu za potrošače. Ključan alat koji osigurava protok informacija kako bi omogućio brzu reakciju kada su rizici za javno zdravlje otkriveni u prehrambenom lancu predstavlja RASFF (eng. *Rapid Alert System for Food and Feed* - Sustav za brzo informiranje o hrani). RASFF je uveden 1979. godine te omogućuje učinkovito dijeljenje informacija između svojih članica i pruža cjelodnevnu uslugu kako bi se osiguralo da se hitne obavijesti šalju, primaju te zajednički i učinkovito reagira na njih. Zahvaljujući RASFF-u, mnogi su rizici sigurnosti hrane bili spriječeni prije nego što su mogli štetiti europskim potrošačima. Temelji se na brzom izmjeni informacija, obavještanju potrošača o povlačenju proizvoda sa tržišta i povrata potencijalno opasne robe putem sljedivosti od proizvođača, prerađivača i subjekata u poslovanju s hranom koji robu stavljaju na tržište. Jedan od segmenata kojim se bavi je i prisutnost alergena u

hrani. U godišnjem izvješću za 2015. godinu dan je prikaz o slučajevima vezanim uz nedeklarirane alergene u kojem je vidljivo da je na prvom mjestu mlijeko, zatim sulfiti te jaja. RASFF sustav dijeli informacije u nekoliko kategorija, od kojih kategorija "alert" označava hitnu informaciju. U izvješću stoji da je za alergene sveukupno bilo 137 slučajeva od kojih je 114 bilo u kategoriji "alert", a 2016. godine sveukupno je bilo 87 slučajeva u kategoriji „alert“ od 113 slučajeva. 2013. godine, Republika Hrvatska je ulaskom u Europsku uniju automatski ušla u RASFF sustav brzog uzbunjivanja u kojem djeluje nacionalnom kontaktnom točkom HR RASFF, a unutar nje je nekoliko kontaktnih točaka (Uprava za sanitarnu inspekciju, Uprava za veterinarske inspekcije, Uprava poljoprivredne i fitosanitarne inspekcije, Državni inspektorat, Hrvatska agencija za hranu, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Hrvatski veterinarski institut). Kontaktne točke predstavljaju nadležna tijela koja u slučaju opoziva robe ili epidemije veće krize, obavještavaju javnost o mjerama koje se poduzimaju u takvom slučaju, a osim toga u svojim laboratorijima provode kontrolna ispitivanja za svu hranu i hranu za životinje dostupnu na tržištu Republike Hrvatske (RASFF, 2017).

Označavanje alergena u hrani značajno se razlikuje u ostatku svijeta. Svaka nadležnost identificira različite prioritete alergena i često nije jasno kojim se kriterijima vodilo kada su sastavljeni popisi alergena. Osim toga, standardi za dodavanje alergena i uklanjanje s popisa se razlikuju. Neki u svojem popisu navode samo pet alergena, a neki čak trinaest. U svim popisima zajednički su: pšenica, jaja, mlijeko, kikiriki i rakovi (Gendel, 2012).

Primjerice, u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) kao zakonodavno tijelo po pitanju hrane djeluje FDA (engl. *Food and Drug Administration*), koje navodi osam kategorija alergena koji predstavljaju 90 % svih nutritivnih alergija. Označavanje alergena važno je i za međunarodnu trgovinu. Na primjer, FDA je odbila 2005. godine jednu četvrtinu od ukupno uvezene hrane iz Kine zbog netočnih informacija o označavanju hrane (Zhou, 2007).

Japan ima prilično jedinstven pristup svom popisu prioriteta, s kratkim obveznim popisom označavanja i duljim preporučenim popisom oznaka. Obvezni popis prioriteta sastoji se od pšenice, mlijeka, jaja, kikirikija, heljde i školjkaša. Rakovi i škampi su identificirani kao jedini školjkaši koji uzrokuju alergije. Isto tako, Japan i Koreja jedine su zemlje koje na popisu imaju heljdu na svojim prioritetnim popisima alergena. Poznato je da heljda uzrokuje česte i povremeno teške alergije u Japanu (Taylor i Baumert, 2015).

U Australiji i Novom Zelandu je 2003. godine uvedena regulativa o označavanju hrane prema zakonima koje je predložila Europska komisija (Direktiva 2003/89/EC), prema kojoj se kao najčešći alergeni obavezno označavaju: kikiriki, orašasti plodovi, mlijeko, jaja, sezam, riba i rakovi, soja i gluten (FSANZ, 2002).

U Kanadi, izvorni popis prioriteta svih alergena obuhvaća školjke mekušaca i sezam, uz standardnih 8 skupina hrane koje su na listi CAC-a (eng. *Codex Alimentarius Commissioni*) iz 1999. godine. Nedavno, Kanada je dodala senf na svoj popis (Ben-Shoshan i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja, prikupljena su i analizirana 24 uzorka keksa i čajnih peciva, pri čemu je 8 uzoraka prikupljeno iz različitih slastičarnica na zagrebačkom tržištu, a 16 uzoraka (različitih proizvođača) iz trgovačkih lanaca na zagrebačkom tržištu.

3.1.2. Ispitanici

U svrhu prikupljanja stavova potrošača o alergenima mlijeka i proizvodima od mlijeka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije, odnosno o prisutnosti tragova mlijeka u keksima i čajnim pecivima proveden je online upitnik (Prilog 1) na uzorku od 82 ispitanika starijih od 18 godina koji su dobrovoljno prisustvovali anketiranju.

3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor

Korišteni su sljedeći uređaji:

- vodena kupelj (INKO, Zagreb)
- analitička vaga (YMC Chyo, tip JK-180 Mikrotehna, Zagreb)
- vortex (VWR, tip VV3)
- centrifuga (Rotofix 32A, Hettich, Njemačka)
- orbitalna i linearna tresilica (slika 3)
- ELISA-čitač s filterom od 450 nm sa računalnim programom Gen 5, Bio Tek Instruments, SAD (slika 4).



Slika 3. Tresilica



Slika 4. ELISA *Microplate reader*

Također je korišteno sljedeće posude i pribor:

- ručni mlinac za usitnjavanje
- nosač za mikrojažice, AgraQuant, Romer Labs, Austrija
- odmjerne tikvice od 50 mL
- odmjerne tikvice od 10 mL
- termometar

- pipeta od 10 mL
- pipeta od 1 mL
- nastavak za pipetu
- staklene čaše od 100 mL
- metalna žlica
- plastične epruvete
- stalak za epruvete
- staničevina
- stakleni lijevak
- filter papir.

3.1.4. Reagensi

- AgraQuant, Milk, Extraction & Sample Dilution Buffer, Romer Labs, Austrija (ekstrakcijski pufer)
- AgraQuant, Milk, Wash Buffer, Romer Labs, Austrija (pufer za ispiranje)
- AgraQuant Milk Enzyme, Romer Labs, Austrija (reagens sa zelenim poklopcem, konjugat) (slika 5)
- AgraQuant-Substrate, Romer Labs, Austrija (reagens s plavim poklopcem) (slika 5)
- AgraQuant-Stop Solution, Romer Labs, Austrija (reagens s crvenim poklopcem) (slika 5)
- Filtrat pročišćenog uzorka.



Slika 5. Reagensi iz seta za ELISA test

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema reakcijskih otopina

Otopina ekstrakcijskog pufera pripravljena je razrjeđivanjem koncentrata iz seta za ELISA test s destiliranom vodom i to u omjeru 1:5 u odmjerne tikvici od 50 mL. Zatim je pripravljena otopina zagrijana do 60°C i nakon toga ohlađena na sobnu temperaturu.

Otopina pufera za ispiranje pripravljena je razrjeđivanjem koncentrata iz seta za ELISA test s destiliranom vodom u omjeru 1:10 u odmjerne tikvici od 50 mL.

Otopine su pripravljene u količinama koje su bile potrebne za taj radni dan.

3.2.2. Ekstrakcija uzoraka

U plastičnu epruvetu izvagano je 0,5 g prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka te je dodano 10 mL razrijeđenog ekstrakcijskog pufera automatskom pipetom. Suspenzija je vorteksirana i stavljena na tresilicu 15 min brzine 250. Nakon toga je centrifugirana 10 min pri 2000 okretaja da se dobije što bistriji supernatant koji je na kraju profiltriran preko filter papira i ljevka, uz odbacivanje taloga. Dobiveni filtrat korišten je za određivanje udjela potencijalnih alergena mlijeka ELISA testom.

3.2.3. ELISA test

3.2.3.1. Princip testa

U ovom radu je korišten AgraQuant milk test koji prema tehnici određivanja pripada "sendvič" ELISA testu. Pomoću ekstrakcijskog pufera proteini mlijeka se ekstrahiraju iz uzorka. Na površini mikrojažica je nanesen tanki sloj primarnih antitijela te se na njega nanošenjem ekstrahiranih uzoraka (ili standarda za potrebe izrade baždarne krivulje) u mikrojažice, vežu proteini mlijeka. Nakon prvog ispiranja dodaje se enzim obilježen sekundarnim antitijelom u mikrojažice i inkubira određeno vrijeme. Slijedi drugo ispiranje i dodavanje supstrata za enzim. U ovoj reakciji dolazi do razvitka plave boje. Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji proteina mlijeka u uzorku (ili standardu). Na kraju se dodaje u mikrojažice „stop" otopina pri čemu prethodno plavo obojenje prelazi u žuto.

Intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri 450 nm, a pomoću prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda mlijeka, se određuje koncentracija potencijalnih alergena mlijeka (mgkg^{-1}).

3.2.3.2. Postupak određivanja

Na držaču je postavljen set mikrojažica obloženih antitijelom, te 100 μL dobivenog filtrata dodano pomoću jednokanalne pipete u svaku jažicu. Za svaki uzorak korišten je novi nastavak za pipetu te je sadržaj nastavka u potpunosti ispražnjen u jažicu.

Zatim je inkubiran držač s jažicama 20 minuta pri sobnoj temperaturi nakon čega je sadržaj mikrojažica ispražnjen u otpadni spremnik i to okretanjem držača jažica naopako. Sadržaj svake jažice je ispran 5 puta s razrijeđenim puferom za ispiranje. U svrhu uklanjanja zaostale vode i potpunog sušenja jažica, na ravnu površinu je posloženo nekoliko slojeva staničevine te su o nju lupkane mikrojažice.

Nakon završenog ispiranja u svaku jažicu je dodano 100 μL konjugata iz bočice sa zelenim poklopcem te inkubirano pri sobnoj temperaturi 20 minuta bez pomicanja držača s jažicama kako ne bi došlo do kontaminacije iz jedne jažice u drugu. Sadržaj mikrojažica ponovno je ispražnjen u otpadni spremnik, a mikrojažice su ponovno isprane 5 puta s razrijeđenim puferom za ispiranje i prosušene lupkanjem o staničevinu kao i u prethodnom postupku ispiranja.

Slijedi korak gdje je 100 μL supstrata iz bočice s plavim poklopcem stavljeno u svaku jažicu i inkubirano pri sobnoj temperaturi 20 minuta u tami. U toj reakciji dolazi do razvitka plavog obojenja.

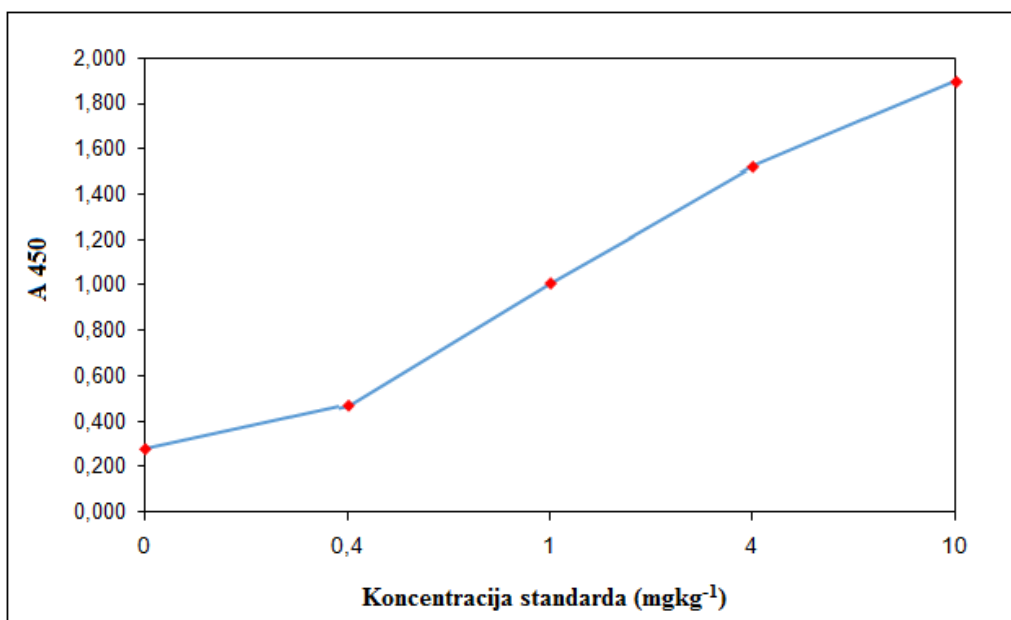
Nakon završene inkubacije u tami, 100 μL „stop“ otopine iz bočice s crvenim poklopcem dodano je u svaku jažicu nakon čega je došlo do promjene boje iz plave u žutu.

Držač s mikrojažicama (slika 6) pažljivo je prenesen do čitača s filterom od 450 nm, a OD-vrijednosti za svaku mikrojažicu pohranjene.



Slika 6. Držač s mikrojažicama

Na osnovu prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda mlijeka (slika 7), određena je koncentracija alergena mlijeka u svakom od analiziranih uzoraka. Koncentracije otopina standarda iznosile su 0, 0,4, 1, 4 i 10 mgkg^{-1} .



Slika 7. Baždarni dijagram standarda mlijeka

3.2.4. Ispitivanje stavova potrošača o alergenima mlijeka i proizvodima koji uzrokuju alergije

Svrha upitnika bila je prikupiti stavove i mišljenja potrošača o mlijeku i proizvodima od mlijeka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije, odnosno o prisutnosti tragova mlijeka u keksima i čajnim pecivima. Upitnik je proveden na uzorku od 82 dobrovoljna ispitanika (23 muškaraca i 59 žena) starijih od 18 godina.

Cilj upitnika bio je dobiti uvid u stavove i mišljenja potrošača vezano za nutritivne alergije; asocijacije na navode u okviru informacija o hrani vezane uz prisutnost alergena; razumijevanje deklariranog te percepciju sigurnosti hrane te povjerenje prema proizvođačima. Upitnik se sastoji od tri grupe pitanja: prva grupa pitanja vezana je uz socio-demografske karakteristike ispitanika, a ostale dvije su usko vezane uz nutritivne alergije te mlijeko kao jedan od izvora alergena. Svih 13 pitanja je zatvorenog tipa od toga je šest s dihotomnim odgovorima (da-ne) i 7 pitanja s ponuđenim odgovorima (Kukić i Markić, 2011). Primjer upitnika nalazi se u prilogima (Prilog 1).

3.2.5. Obrada podataka

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja ELISA testom određen je udio potencijalnih alergena mlijeka u uzorcima keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca (KT1 – KT12, KMT1 – KMT4) i slastičarnica (KS1 – KS5, KMS1 – KMS3). Također, ispitani su stavovi potrošača o mlijeku i proizvodima od mlijeka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Rezultati određivanja udjela potencijalnih alergena mlijeka (mgkg^{-1}) prikazani su u tablicama 2, 4 i 5. Stavovi potrošača, prikupljeni putem upitnika, prikazani su grafički na slikama 8 – 14.

4.1. Udio potencijalnih alergena mlijeka određen ELISA testom u uzorcima keksa i čajnih peciva

Tijekom ovog istraživanja proveden je ELISA test kojim je određena prisutnost alergena mlijeka u uzorcima keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca i slastičarnica. Set za ELISA test AgraQuant Milk Assay nabavljen je od proizvođača Romer Labs, Austrija. Limit detekcije ELISA testa iznosi $0,05 \text{ mgkg}^{-1}$. Udio alergena mlijeka izražen je u mgkg^{-1} .

Usporedno s rezultatima ELISA testa, tablično su prikazani navodi u okviru informacija o hrani pripadajućih analiziranih proizvoda (tablica 3) koji su neposredno vezani uz eventualnu prisutnost alergena mlijeka. Rezultati određivanja grupirani su prema mjestu nabavke (trgovački lanac ili slastičarnica) te ukazuju na prisutnost alergena mlijeka u uzorcima analiziranim ELISA testom (tablice 2, 4 i 5).

U tablici 2 su prikazani rezultati određivanja alergena mlijeka u uzorcima keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca (KT1-KT12).

Tablica 2. Udio (mgkg^{-1}) alergena mlijeka u uzorcima ($n=12$) keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca

Uzorak	Udio alergena mlijeka [mgkg^{-1}] (srednja vrijednost \pmSD)
KT1	0,66 \pm 0,001
KT2	0,61 \pm 0,002
KT3	0,23 \pm 0,001
KT4	0,53 \pm 0,001
KT5	0,60 \pm 0,003
KT6	0,65 \pm 0,002
KT7	< LOD
KT8	0,70 \pm 0,001
KT9	0,53 \pm 0,003
KT10	0,70 \pm 0,002
KT11	< LOD
KT12	< LOD
Prosječna vrijednost	0,58
Raspon	0,23 – 0,70

Alergeni mlijeka detektirani su u 9 od 12 analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca. Samo tri uzorka (KT7, KT11 i KT12) sadržavala su udio alergena mlijeka ispod limita detekcije. Udio alergena mlijeka kretao se u rasponu od 0,23 mgkg^{-1} (KT3) do 0,70 mgkg^{-1} (KT8 i KT10), pri čemu je prosječna vrijednost iznosila 0,58 mgkg^{-1} . U tablici 3 prikazani su i navodi o prisutnosti alergena u analiziranim proizvodima u onom obliku kako se nalaze na samom proizvodu.

Tablica 3. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca vezani uz prisutnost alergena mlijeka

UZORAK	Navod vezan uz prisutnost alergena mlijeka
KT1	Može sadržavati mlijeko, kikiriki i drugo orašasto voće u tragovima.
KT2	Može sadržavati mlijeko.
KT3	Može sadržavati jaja, kikiriki i mlijeko.
KT4	Može sadržavati sezam i mlijeko.
KT5	Može sadržavati mlijeko, kikiriki, orašasto voće.
KT6	Može sadržavati soju, mlijeko, orašasto voće.
KT7	Može sadržavati mlijeko u tragovima.
KT8	Bez navoda (Proizvod sadrži pšenični gluten i soju.)
KT9	Bez navoda (pšenično brašno)
KT10	Bez navoda (pšenično brašno, raženo brašno, jaja, orasi)
KT11	Bez navoda
KT12	Bez navoda (Može sadržavati jaja i soju u tragovima.)

Uzorci KT1 – KT7 sadržavali su u okviru informacija o hrani navod o mogućoj prisutnosti alergena mlijeka (tablica 3). ELISA testom u ovim uzorcima detektirana je prisutnost alergena mlijeka. Stoga su sami navodi opravdani jer je vjerojatno tijekom proizvodnje došlo do križne kontaminacije zbog široke palete proizvoda proizvođača.

U uzorcima KT8 – KT12 detektirani su alergeni mlijeka unatoč tome što ne sadrže navode o prisutnosti alergena mlijeka. Najviši udio alergena je pri tome izmjeren u uzorcima KT8 i KT10 u iznosu od 0,70 mgkg⁻¹.

Tablica 4. Udio (mgkg^{-1}) alergena mlijeka u uzorcima ($n=5$) keksa i čajnih peciva iz slastičarnica

Uzorak	Udio alergena mlijeka [mgkg^{-1}] (srednja vrijednost \pmSD)
KS1	0,25 \pm 0,015
KS2	< LOD
KS3	< LOD
KS4	0,08 \pm 0,02
KS5	0,07 \pm 0,03
Prosječna vrijednost	0,14
Raspon	0,07 – 0,25

Alergeni mlijeka detektirani su u 3 od 5 analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz slastičarnica. Dva uzorka (KS2 i KS3) sadržavala su udio alergena mlijeka ispod limita detekcije. Udio alergena mlijeka kretao se u rasponu od 0,07 mgkg^{-1} (KS5) do 0,25 mgkg^{-1} (KS1), pri čemu je prosječna vrijednost iznosila 0,14 mgkg^{-1} .

Slastičarnice kao subjekti u poslovanju s hranom nude nepretpakiranu hranu. Prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 dužni su informirati potrošače o potencijalnoj prisutnosti alergena u hrani bilo pisanim ili usmenim putem. Informacija o mogućim alergenima iz mlijeka u uzorcima iz slastičarnica (KS1 – KS5 te KMS1 – KMS3), analiziranim tijekom ovog istraživanja, dobivena je usmenim putem, a odgovor je za svaki proizvod bio negativan, tj. da ne sadrži mlijeko i da nije moguća križna kontaminacija. Kako rezultati dobiveni ELISA testom ukazuju na prisutnost alergena, potreban je oprez u smislu informiranja potrošača.

Rezultati određivanja potencijalnih alergena mlijeka u uzorcima keksa s maslacem iz trgovačkih lanaca i slastičarnica prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Udio (mgkg^{-1}) alergena mlijeka u uzorcima ($n=7$) keksa s maslacem iz trgovačkih lanaca (KMT1 – KMT4) i slastičarnica (KMS1 – KMS3)

Uzorak	Udio alergena mlijeka [mgkg^{-1}] Srednja vrijednost \pmSD
KMT1	1,51 \pm 0,041
KMT2	0,94 \pm 0,003
KMT3	0,92 \pm 0,003
KMT4	>10
KMS1	>10
KMS2	>10
KMS3	>10
Prosječna vrijednost	1,12
Raspon	0,92 – 1,51

U uzorcima keksa s maslacem iz trgovačkih lanaca (KMT1 – KMT3) detektirani su potencijalni alergeni mlijeka i to u rasponu od $0,92 \text{ mgkg}^{-1}$ (KMT3) do $1,51 \text{ mgkg}^{-1}$ (KMT1). Prosječna vrijednost u ovim uzorcima iznosi $1,12 \text{ mgkg}^{-1}$. U uzorku KMT4 određeni udio je iznosio više od 10 mgkg^{-1} . Alergeni mlijeka detektirani su u sva 3 analizirana uzorka keksa s maslacem iz slastičarnica (KMS1 – KMS3) i to u udjelima višim od 10 mgkg^{-1} .

U istraživanju Yanagida i suradnika (2015) praćen je utjecaj maslaca i zagrijanog mlijeka pri razvitku alergijske reakcije kod djece. Šezdeset i osam djece (srednja dob 3,9 godine) podvrgnuto je ovom istraživanju. Šest djece je reagiralo na maslac u uzorku. Četiri je imalo minimalne simptome i nije ih bilo potrebno liječiti. Jedan je otežano disao te mu je pružena pomoć primjenom oralnog antihistaminika, steroida i inhalacijskog bronhodilatatora. Drugi sudionik se žalio na simptome poput kašlja, svrbeža u grlu i cijelom tijelu koji su nestali nakon uzimanja oralnog antihistaminika. Kako se maslac koristi u velikom broju namirnica, kao što su slatkiši, začini, keksi i kolači, neophodno je bilo istražiti sam njegov utjecaj na organizam. Sastoji se od mliječne masti, proteina i vode. Taj mali udio proteina u maslacu može utjecati na ljude koji su alergični na mlijeko. Ukoliko takva osoba može tolerirati maslac, povećava se broj namirnica koje može konzumirati. Opasnost je veća kod djece jer su

ona najsklonija alergijama na mlijeko, a i veći su konzumenti keksa i čajnih peciva te slatkiša gdje se često koristi maslac u recepturi (Yanagida i sur., 2015).

U istraživanju Surojanametakul i suradnika (2012) u kojem su prikupljena 142 uzorka iz različitih restorana, određen je pomoću ELISA testa udio alergena u hrani (jaja, mlijeko, pšenica i kikiriki) te su s dobivenim rezultatima uspoređene deklaracije. 21 uzorak je bio pozitivan na kazein, pri čemu na deklaraciji nije bilo navedeno da sadrži mlijeko ili mliječne dodatke. Autori navode kako proizvodi u kojima se kao sastojak pojavljuje vrhnje ili kokosovo vrhnje mogu sadržavati dodanu mliječnu mast kako bi se obogatio okus i tekstura proizvoda, ali takav navod se ne nalazi na deklaracijama čime se potrošača dovodi u zabunu da takav proizvod ne sadrži alergene mlijeka, a osobe alergične na mlijeko u opasnost. Razlog prisutnosti alergena može biti posljedica namjernog dodatka alergena, a da se pritom ne navodi na deklaraciji ili pak križna kontaminacija (Surojanametakul i sur., 2012).

Tolin i suradnici (2012) su analizirali 25 komercijalnih uzoraka vina (12 bijelih vina, 12 crvenih vina te jedno rose vino), kupljenih u trgovačkom lancu, te istražili kolika je vjerojatnost da se u takvim proizvodima nalaze rezidue alergena mlijeka i jaja (koriste se proteini za bistrenje vina) pomoću LC-MS/MS metode, a nakon procesa pročišćavanja u proizvodnji vina gdje se uklanjanju ti dodaci. Potvrđena je prisutnost β -kazeina i α_{s1} -kazeina u rose vinu te β -kazeina u jednom uzorku bijelog vina čime je ukazano da i ovi proizvodi mogu biti potencijalno opasni za osobe koje su alergične na mlijeko (Tolin i sur., 2012).

Prisutnost alergena mlijeka su također istraživali Spanjersberg i suradnici (2015) u 10 uzoraka tamne čokolade koja se koristi za ukrašavanje deserta, a na kojoj nije bilo navedeno da sadrži mlijeko te koje su to koncentracije koje mogu izazvati simptome kod potrošača. U svih 10 uzoraka je detektiran sadržaj alergena mlijeka. Najviša koncentracija je iznosila 3547 mgkg^{-1} , a najniža 2 mgkg^{-1} . Na najnižu koncentraciju reagiralo bi 0,2% muških te 0% ženskih ispitanika dok bi na najvišu koncentraciju reagiralo 12,2% muških te 9,2% ženskih ispitanika. Ova studija je provedena kako bi se istražilo u kojoj mjeri su koncentracije alergena u neoznačenim proizvodima relevantne za javno zdravlje. Pokazalo se da su koncentracije proteina mlijeka u tamnoj čokoladi za ukrašavanje rezultat križne kontaminacije koja može izazvati ozbiljne reakcije kod potrošača. Očito, označavanje je mjera predostrožnosti koja zahtijeva smjernice u smislu definiranja točne koncentracije alergena u namirnicama, bile one zanemarive ili više, a kako bi potrošač mogao izabrati proizvode u kojima koncentracija takvog alergena ne bi kod te osobe dovela do alergijske reakcije, te mu time ne bi bio sužen izbor namirnica u prehrani (Spanjersberg i sur., 2015).

U istraživanju Ford i suradnika (2010) u SAD-u, prikupljeno je oko 100 proizvoda kupljenih u trgovačkim lancima u kojima je analizirana prisutnost alergena mlijeka, jaja i kikirikija i to u 2 kategorije s obzirom na deklariranje istog: na onima kojima nije naznačena moguća prisutnost alergena te s navodom da [Može sadržavati]. U prvoj kategoriji pozitivno su bila 4 od 143 uzorka na alergene mlijeka, a u drugoj 6 od 59 uzoraka. Zanimljivo je to što su bili pozitivni samo uzorci koji su bili proizvedeni u manjim industrijama (Ford i sur., 2010).

Crotty i Taylor (2010) su istraživali koncentraciju alergena mlijeka u 100 uzoraka s obzirom na različite navode o mlijeku na deklaracijama. Usporedbe su provedene između veličina industrija i kategorije hrane kako bi se utvrdilo jesu li nastale razlike među tim klasifikacijama. Od 81 proizvoda, 50 uzoraka je bilo označeno sa [može sadržavati], 57 uzoraka označeno je [zajedničkom opremom], 40 uzoraka [zajednički objekt] i 3 uzorka imali su druge jedinstvene oznake. U 15 uzoraka je navedeno mlijeko kao sastojak koji je dodan u malim količinama, dok je u 4 uzorka bilo naznačeno kako je korištena samo mliječna mast. Proizvodi su kategorizirani kao pečena hrana/mješavine, slatkiši od tamne čokolade, ostali slatkiši/slastice, žitarice, smrznuti deserti, instant hrana, prehrambeni/granola prutići, snack proizvodi. Dobiveni rezultati su širokog raspona te se, obzirom na način deklariranja tragova alergena mlijeka, došlo do zaključka kako nije vidljiva veza između navoda i koncentracije alergena. Koncentracije su se pri tome kretale u rasponu od 3,4 do 15 000 mgkg⁻¹. Proizvod koji je imao jedinstvenu oznaku imao je koncentraciju alergena od 15 000 mgkg⁻¹. Također, u proizvodima u kojima je mlijeko označeno kao omanji sastojak, koncentracija se kretala od 4,0 – 1400 mgkg⁻¹. Uzorci tamne čokolade imali su prilično visoku koncentraciju tragova mlijeka, u rasponu od 3,7 do 15,000 mgkg⁻¹. Samo nekoliko proizvoda iz ostalih kategorija imalo je koncentraciju mlijeka višu od 1000 mgkg⁻¹ (Crotty i Taylor, 2010).

Monaci i suradnici (2011) su ELISA metodom (različitih proizvođača kitova) analizirali udio alergena mlijeka u uzorcima keksa prije i poslije pečenja, u koje je namjerno dodano obrano mlijeko u prahu, te su također istraživali kako različiti postupci ekstrakcije proteina utječu na rezultate. Tijekom pečenja keksa, smanjuje se udio alergena jer dolazi do denaturacije proteina te se postupkom ekstrakcije smanjuje njihova sposobnost izdvajanja, čime se ukazuje na potrebu dodatne provjere nekom drugom metodom.

U radu Dumont i suradnika (2010) analizirani su alergeni mlijeka i testirani različiti kitovi ELISA testa, različitih proizvođača, i to na uzorcima keksa koji su bili pripremljeni u kućanstvu. Keksi su namjerno pripremljeni s dodatkom maslaca i obranog mlijeka u prahu. Rezultati ELISA testova od različitih proizvođača bili su usporedivi čime su omogućeni budući postupci validacije ove metode.

Weber i suradnici (2006) uspoređivali su tekućinsku kromatografiju u tandemu s masenom spektrometrijom (LC- MS/MS) s ELISA metodom tijekom analiza različitih uzoraka, pri čemu je jedan od uzoraka bio keks kupljen u trgovačkom lancu. Dokazali su da se LC-MS/MS metoda može koristiti za analizu alergenskih proteina u uzorcima hrane. Također, metoda se može koristiti i za potvrđivanje drugih metoda kao što je ELISA. Istraživači su također ilustrirali sposobnost pretraživanja MS/MS baza podataka kako bi pružili pouzdanu potvrdu prisutnosti ili odsutnosti alergenskih proteina mlijeka, prvenstveno kazeina.

Gomaa i Boye (2015) su također analizirali različite alergene u uzorcima keksa, u koje su namjerno dodani različiti alergeni. Jedan od alergena bio je kazein koji je određen pomoću ELISA metode, LC-MS metode te metode protočne citometrije pogodne za određivanje više alergena u jednom uzorku. Analiziran je udio kazeina prije i poslije pečenja kao i udio kazeina u slučaju kada uzorak sadrži više vrsta alergena (protein soje i gluten). Zaključeno je kako se protočna citometrija može koristiti za istodobno određivanje više alergena u jednom uzorku, a prednost metode je ponovljivost, specifičnost, osjetljivost, skraćeno vrijeme dobivanja rezultata te manji broj uzoraka.

4.2. Percepcija potrošača o mlijeku i proizvodima od mlijeka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije

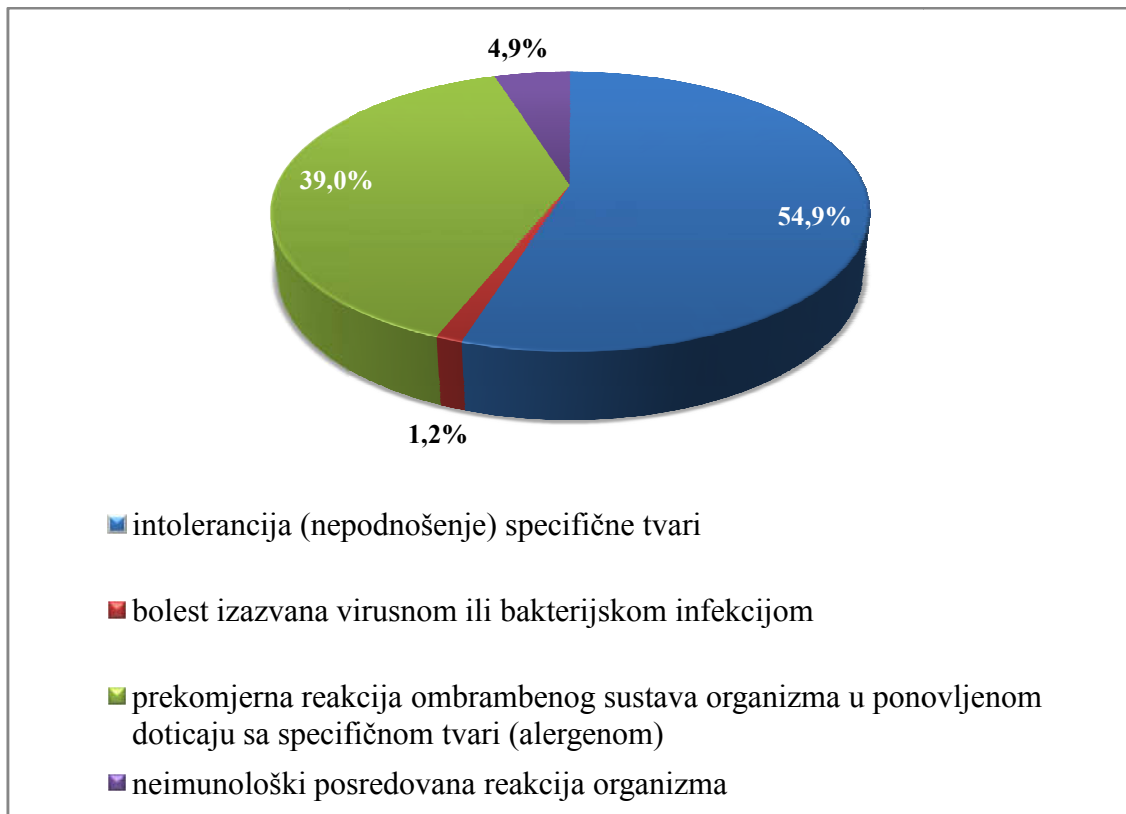
Tijekom ovog istraživanja ispitani su stavovi i mišljenja potrošača o mlijeku i proizvodima od mlijeka kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Ispitivanje je provedeno putem posebno osmišljenog online upitnika (Prilog 1). Anketirana su 82 dobrovoljna ispitanika. Odgovori na pitanja iz upitnika prikazani su tablično i grafički.

U tablici 6 prikazane su demografske karakteristike ispitanika (n=82).

Tablica 6. Demografske karakteristike ispitanika (n=82)

Demografski podaci	N	%
Spol		
Žene	59	72
Muškarci	23	28
Dob		
Studentska populacija (18-30 god)	58	70,7
Rana odrasla dob (30-40 god)	20	24,4
Srednja dob (40-60 god)	4	4,9
Kasna odrasla dob (>60 god)	0	0
Obrazovanje		
Osnovna škola	1	1,2
Srednja škola	33	40,2
Sveučilišna razina (fakultet)	48	58,5
Životno okruženje		
Selo	53	64,6
Grad	29	35,4
Ukupno	82	100

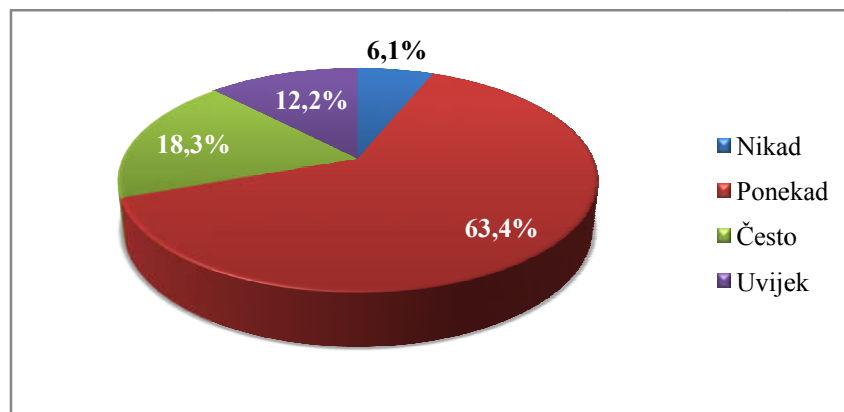
Od ukupno 82 ispitanika, žena je bilo 72%, a muškaraca 28%. Većina ispitanika (70,7%) je bila u dobi od 18 do 30 godina, a s obzirom na životno okruženje samo je manji dio ispitanika (35,4%) naveo kako živi u gradu. Što se tiče obrazovanja, 40,2% ispitanika je završilo srednju školu, 1,2% imalo završeno samo osnovnu školu dok su ostali imali sveučilišni status.



Slika 8. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=82) na pitanje „Što je alergija?“

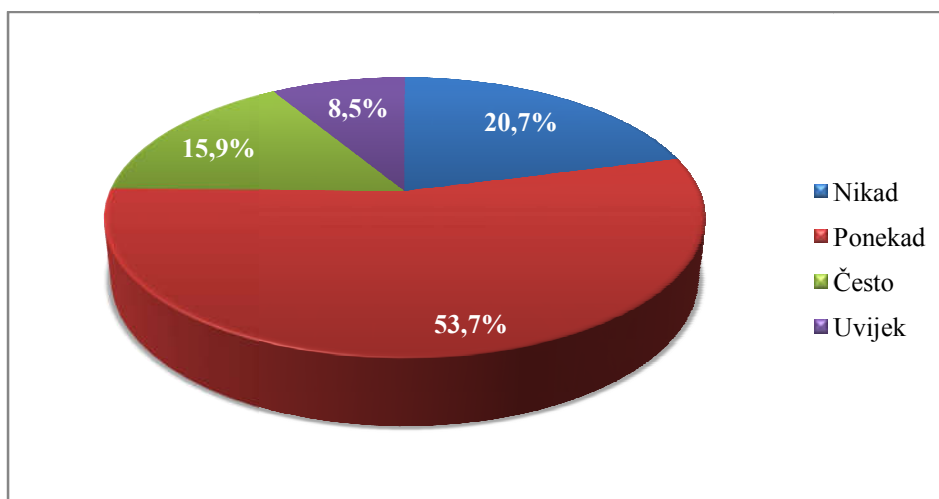
Odgovori na pitanje „Što je alergija?“ ukazuju kako je većina (54,9%) upoznata s tim pojmom, no ipak velik broj ispitanika (39,0%) smatra kako su alergija i intolerancija isti pojmovi (slika 8). Važno je napomenuti da su to dva različita pojma gdje je važno razlikovati imunološki posredovanu reakciju na sastojak hrane (protein) kada govorimo o alergiji na određenu hranu, te intoleranciju na određeni sastojak hrane (primjerice laktozu) koja nije posredovana imunološkim sustavom. Između ispitanika koji su se izjasnili da imaju nutritivnu alergiju (12), njih petero je navelo da su alergični na mlijeko. Ostalih 70 ispitanika nema nutritivnu alergiju.

U istraživanju Lam i suradnika (2008) udio oboljelih od alergije na mlijeko u promatranom razdoblju od 14 godina je vrlo nizak u odnosu na alergene iz kikirikija, lješnjaka te jabuke gdje je taj postotak čak 10 puta veći, a sama alergija je češća kod djece nego u odrasloj dobi (Lam i sur., 2008).



Slika 9. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=82) na pitanje „Kupujete li kekse ili čajna peciva u trgovačkom lancu ili slastičarnici?“

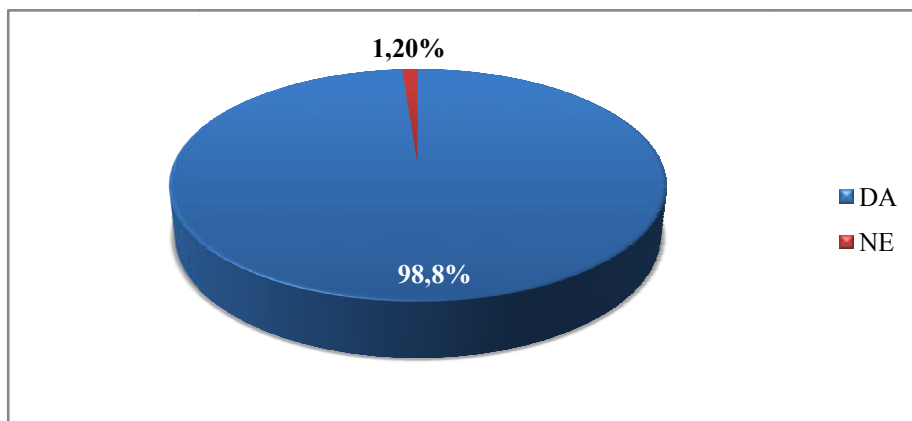
Keksi i čajna peciva su popularni međuobrok, a s razvojem tehnologije smanjuje se udio masnoće, te neki sastojci poput mlijeka zamjenjuju drugima kako bi osobe alergične na mlijeko mogle konzumirati takove proizvode. 63,4% ispitanika se izjasnilo da ponekad kupuje navedene proizvode u slastičarnici ili trgovačkom lancu (slika 9). Statistički podaci o utrošku hrane i pića u kućanstvima u 2014. godini pokazuju da svaki član kućanstva prosječno pojede 7,8 kg pekarskih proizvoda te popije 66,2 L mlijeka (DZS, 2017).



Slika 10. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=82) na pitanje „Koliko često čitate deklaraciju na proizvodima kao što su kekse ili čajna peciva?“

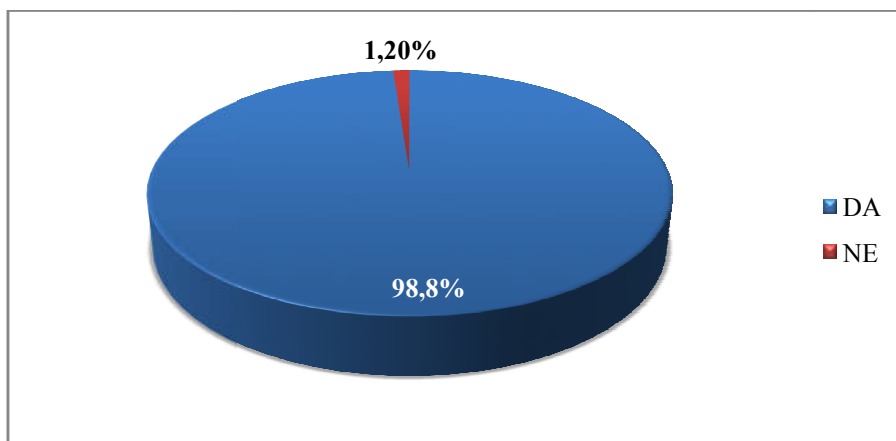
Iz rezultata prikazanih na slici 10 vidljivo je da se relativno mali postotak ispitanika izjasnio kako uvijek (8,5%) čita deklaracije na proizvodima kao što su kekse ili čajna peciva. Većina ispitanika izjasnila se kako ponekad (53,7%) čita deklaracije na proizvodima poput kekse i čajnih peciva.

Sve više potrošača u današnje doba čita deklaraciju na proizvodima poput keksa i čajnih peciva, što su i dobiveni rezultati pokazali, bilo da je razlog sve veća naglašenost na pravilnu prehranu ili da je u pitanju porast broja osoba koje pate od neke nutritivne alergije ili intolerancije (na laktozu ili gluten). S obzirom na spol ispitanika, oko 64,7% ispitanika muškoga spola izjasnilo se kako nikada ne čita deklaracije na proizvodima poput keksa i čajnih peciva, dok je u slučaju ispitanika ženskog spola takvih 35,3%.



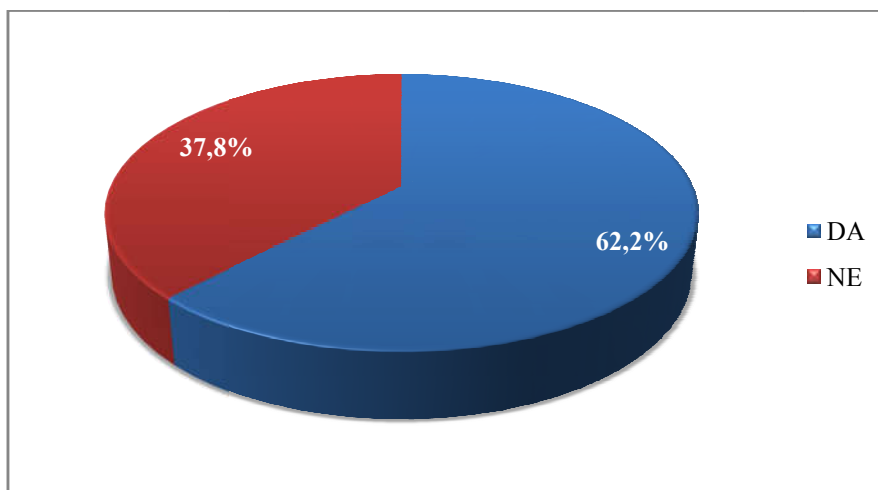
Slika 11. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=82) na pitanje „Smatrate li da keksi ili čajna peciva mogu sadržavati tragove mlijeka?“

Od 82 ispitanika, njih 81 (slika 11) smatra da keksi ili čajna peciva mogu sadržavati tragove mlijeka. Rezultati odgovora ispitanika na ovo pitanje ukazuju kako ispitanici smatraju da keksi i čajna peciva u recepturi sadrže mlijeko, što ne mora uvijek biti slučaj.



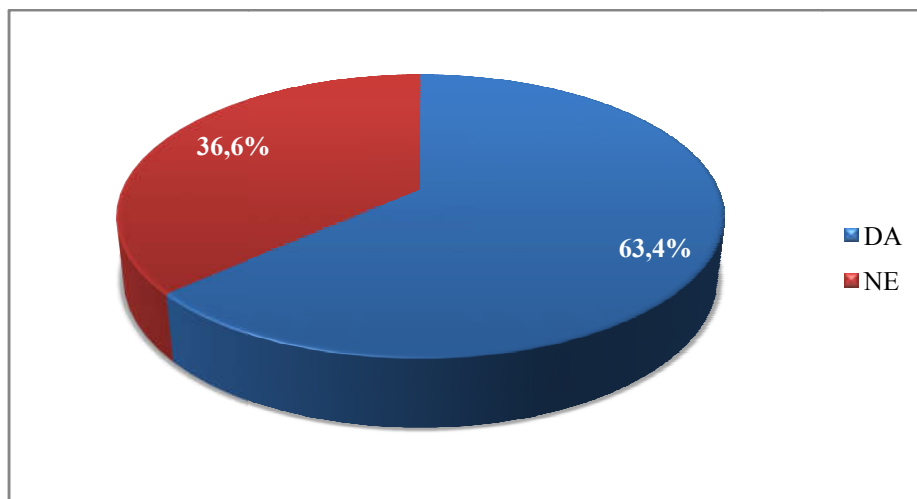
Slika 12. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=82) na pitanje „Smatrate li da keksi s maslacem ili čajna peciva s maslacem mogu sadržavati tragove mlijeka?“

Na Slici 12 vidljivo je da 81 ispitanik od ukupno 82 smatra da keks s maslacem ili čajno pecivo s maslacem sadrži tragove mlijeka. Maslac je nusproizvod u proizvodnji mlijeka i sadrži 80-82% mliječne masti, 16-17% vode te 1-2% mliječnih tvari (npr. proteini, laktoza). Potrošači su s toga upoznati s pojmom maslaca i proizvodnje maslaca kao i njegovim dodatkom u proizvode poput keksa i čajnih peciva te ih nije zbunilo ovo pitanje.



Slika 13. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=82) na pitanje „Ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što su keksi ili čajna peciva nema navoda o mogućoj prisutnosti mlijeka, smatrate li da taj proizvod ne sadrži tragove mlijeka?“

Potrošači se često oslanjaju na navedene informacije o hrani na proizvodima koje bi trebale biti istinite i razumljive svakome te ne bi smjele obmanjivati potrošače. 62,2% ispitanika (slika 13) smatra da ukoliko keks ili čajno pecivo u okviru informacija o hrani ne sadrže navod o sadržaju mlijeka, da takav proizvod zaista ne sadrži mlijeko. U ovom istraživanju ELISA testom kod 6 uzoraka keksa i čajnih peciva utvrđena je prisutnost alergena, a proizvod nije sadržavao nikakvu napomenu o mlijeku.



Slika 14. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=82) na pitanje „Ako imate ili poznajete nekoga tko ima alergiju na mlijeko, da li bi kupili keks ili čajno pecivo koje na deklaraciji ne sadrži navod o prisutnosti mlijeka?“

63,4% ispitanika bi ponudilo osobama koje imaju alergiju na mlijeko keks ili čajno pecivo ukoliko na tom proizvodu nema navoda o prisutnosti mlijeka (slika 14).

Istraživanja o potrošačima (Ranilović i Colić Barić, 2013; Hefle i sur., 2007) dovela su do zaključaka kako su prijeko potrebne edukacije potrošača jer potrošač često ili ne razumije ili krivo protumači deklaraciju na prehrambenim proizvodima. Potrebno je također razviti sustav brze detekcije tragova alergena u industriji radi zaštite samog potrošača te voditi računa o navedenoj problematici kroz zakonsku regulativu i edukaciju potrošača.

FARE (eng. *Food Allergy Research & Education*) i *Food Allergy Canada* provodili su istraživanje u SAD-u i Kanadi vezano uz temu koliko potrošači razumiju deklaracije na proizvodima te su istraživali njihove kupovne navike, pri čemu su u istraživanju sudjelovali potrošači koji su i sami imali nutritivnu alergiju ili su pak članovi njihove obitelji ili njihovi poznanici morali imati nutritivnu alergiju. Analiza je provedena na 6684 ispitanika od kojih je 33,9% bilo alergično na mlijeko. 99,5% se izjasnilo da kupuje procesiranu hranu. Kako se na tržištu nalaze mnogi navodi na deklaracijama u slučaju nenamjerne prisutnosti alergena u proizvodu, 87,7% ispitanika se izjasnilo da nikada ne bi kupilo proizvod na kojemu piše navod [Može sadržavati alergene:] dok kod navoda [Dobra proizvodna praksa se koristi za odvajanje sastojaka u objektu koji također obrađuje alergene] taj postotak pada na 25,2%. Takvi navodi su proizvoljni od strane proizvođača čime mogu zbunjivati potrošača u smislu da postoje različite razine opasnosti u konzumiranju proizvoda s obzirom na navode (Marchisotto i sur., 2017).

U istraživanju Battisti i suradnika (2017) provedenom u Francuskoj, na 77% proizvoda od 17309, spomenut je barem jedan alergen na popisu sastojaka ili u navodu. Kod 23% proizvoda nije bio označen niti jedan alergen niti je postojala napomena o sadržaju takovih sastojaka. Na primjer, u kategoriji hrane s najviše navedenih potencijalnih alergena (za jedan ili više alergena) bile su žitarice, čokoladni proizvodi, ledene kreme i sorbeti te kolači i keksi. Kategorije hrane s najmanje navedenih potencijalnih alergena radi predostrožnosti su mliječni pripravci za dojenčad, bezalkoholna pića, voćne kaše, kompoti i deserti, voćni sokovi i nektari, sirupi te konzervirano voće.

Označavanje proizvoda potencijalnim alergenima u smislu predostrožnosti smanjuje raznolikost odabira proizvoda potrošačima oboljelim od nutritivne alergije, ali se time osigurava proizvođač u slučaju ukoliko dođe do zanemarivanja napomene, a time i do alergijskih reakcija u takovih potrošača (Battisti i sur., 2017).

5. ZAKLJUČCI

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

1. Imunoenzimskom ELISA metodom, u 9 od 12 analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca detektirana je prisutnost alergena mlijeka pri čemu se udio kretao u rasponu od $0,23 \text{ mgkg}^{-1}$ (KT3) do $0,70 \text{ mgkg}^{-1}$ (KT8 i KT10). Uzorci (KT8 i KT10) s najvišim udjelom alergena mlijeka nisu u okviru informacija o hrani sadržavali navod vezan uz prisutnost alergena mlijeka.
2. Udio alergena mlijeka, detektiranih u 3 od 5 analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz slastičarnica, iznosio je od $0,07 \text{ mgkg}^{-1}$ (KS5) do $0,25 \text{ mgkg}^{-1}$ (KS1) pri čemu informacije o hrani analiziranih proizvoda nisu pružale navode vezane uz prisutnost alergena mlijeka.
3. U svih 7 analiziranih uzoraka keksa s maslacem iz trgovačkih lanaca i slastičarnica detektirani su alergeni mlijeka, pri čemu su niži udjeli određeni u uzorcima keksa s maslacem iz trgovačkih lanaca.
4. Većina ispitanika (98,8 %) smatra kako keksi ili čajna peciva mogu sadržavati tragove mlijeka, a 54,9 % ispitanika upoznato je s pojmom alergija.
5. Keks ili čajno pecivo koje na deklaraciji ne sadrži navod o prisutnosti mlijeka kupilo bi 63,4 % ispitanika koji imaju ili poznaju nekoga tko ima alergiju na mlijeko, a 62,2 % ispitanika smatra kako keksi ili čajna peciva ne sadrže tragove mlijeka ukoliko na deklaraciji takovih proizvoda nema navoda o mogućoj prisutnosti mlijeka.
6. ELISA metodom su tijekom ovog istraživanja u 6 uzoraka bez navoda vezanih uz prisutnost alergena mlijeka, od ukupno 24 analizirana, detektirani alergeni mlijeka.

6. LITERATURA

Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Benrejeb Godefroy, S., Ulberth, F., Van Hengel, A.J., Roberts, J., Akiyama, H., Popping, B., Yeungi, J.M., Wehling, P., Taylor, S.L., Poms, R.E., Delahaut, P. (2010) Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices. *J. AOAC Int.* **93**, 442-450.

Anibarro, B., Seoane, F.J., Múgica., M.V. (2007) Involvement of Hidden Allergens in Food Allergic Reactions. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **17**, 168-172.

Anonymous 1 (2017) konkurentni ELISA test <<https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>> Pristupljeno 22.kolovoza 2017.

Anonymous 2 (2017) "sendvič" ELISA test <<http://ib.bioninja.com.au/options/untitled/b4-medicine/elisa.html>> Pristupljeno 22.kolovoza 2017.

Battisti, C., Chambeft, A., Digaud, O., Duplessis, B., Perrin, C., Volatier, J-L., Gauvreau-Béziat, J., Menard, C. (2017) Allergens labeling on French processed foods – an Oqali study. *Food Sci. Nutr.* **5**, 881-888.

Ben-Shoshan, M., Harrington, D.W., Soller, L., Fragapane, J., Joseph, L., St Pierre, Y., Godefroy, S.B., Elliot, S., Clarke, A.E. (2010) A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 1327-1335.

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

Bock, S.A., Munoz-Furlong, A., Sampson H.A. (2007) Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 1016-1018.

Bošnjir, J., Colić Barić, I., Ćurić, D., Mandić, M., Pollak, L., Teklić, T., Valek, M. (2009) Alergije podrijetlom iz hrane. HAH- Hrvatska agencija za hranu, <https://www.hah.hr/pdf/alergije_brosura.pdf>. Pristupljeno 15. kolovoza 2017.

Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda. Priručnik, Plejada, Zagreb.

Brandtzaeg, P. (2011) The gut as communicator between environment and host: Immunological consequences. *Europ. J. Pharm.* **668**, 16-32.

Buttriss, J. (2001) Adverse reactions to food, John Wiley & Sons, Blackwell Science. Oxford.

Coombs R., Gell P. (1975) Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. U: Clinical Aspects of Immunology (Gell P., Combs R., Lackman P., ured.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, str. 761-782.

Crotty, M.P., Taylor, S.L. (2010) Risks associated with foods having advisory milk labeling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 935-937.

Čvorišćec, B., Marković-Stipić, A., Ostojić, V. (2001) Genetički preinačene namirnice - novi izvor alergena? Genetički preinačena hrana-zdravstveni rizik, da ili ne? Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb.

Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske (DZS) <https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2015/14-01-04_01_2015.htm > Pristupljeno 23. Kolovoza 2017.

Du Toit, G., Meyer, R., Shah N., Heine, R.G., Thomson, M.A., Lack, G., Fox, A.T. (2010) Identifying and managing cow's milk protein allergy. *Arch. Dis. Child Educ. Pract. Ed.* **95**, 134-144.

Dumont, V., Kerbach, S., Poms, R., Johnson, P., Mills, C., Popping, B., Tomoskozi, S., Delahaut, P. (2010) Development of milk and egg incurred reference materials for the validation of food allergen detection methods. *Qual. Assur. Saf. Crop.* **2**, 208-215.

El-Agamy, E.I. (2007) The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Res.* **68**, 64-72.

Fiocchi, A., Brozek, J., Schunemann, H., Bahna, S.L., Von Berg, A., Beyer, K., Bozzola, M., Bradsher, J., Compalati, E., Motohiro Ebisawa, M., Guzman, M.A., Li, H., Heine, R.G., Keith, P., Lack, G., Landi, M., Martelli, A., Rancé, F., Sampson, H., Stein, A., Terracciano, L., Vieths, S. (2010) World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *WAO Journal.* 61-161.

Ford, L.S., Taylor, S.L., Pacenza, R., Niemann, L.M., Lambrecht, D.M., Sicherer, S.H. (2010) Food allergen advisory labeling and product contamination with egg, milk, and peanut. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 384-385.

FSANZ (2002) FSANZ- Food Standards Australia New Zealand, <
<http://www.foodstandards.gov.au/industry/safetystandards/Pages/default.aspx> >
Pristupljeno 22.kolovoza 2017.

Gendel, S.M. (2012) Comparison of international food allergen labeling regulations. *Reg. Toxicol. Pharm.* **63**, 279-285.

Gomaa, A., Boye, J. (2015) Simultaneous detection of multi-allergens in an incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). *Food Chem.* **175**, 585-592.

Hefle, S. L., Furlong, T. J., Niemann, L., Lemon-Mule, H., Sicherer, S., Taylor, S. L. (2007) Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 171-176.

Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Spitzauer, S., Valenta, R. (2014) Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*. **66**, 22-33.

Isolauri, E. (1997) Cow-milk allergy. *Environ. Toxicol. Phar.* **4**, 137-141.

Kanceljak-Macan, B., Macan, J. (2000) Modern Life-style and Allergic Diseases. *Medicus*. **9**, 73-77.

Kattan, J.D., Cocco, R.R., Jarvinen, K.M. (2011) Milk and Soy Allergy. *Pediatr. Clin. North Am.* **58**, 407-426.

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

Lam, H-Y., Van Hoffen, E., Michelsen, A., Guikers, K., Van der Tas, C.H.W., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Knulst, A.C. (2008) Cow's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved. *Clin. Exp. Allergy*. **38**, 995-1002.

Lockey, R.F., Bukantz, S.C., Bousquet, J. (2004) Allergens and allergen immunotherapy. Marcel Dekker, New York.

Marchisotto, M.J., Harada, L., Kamdar, O., Smith, B.M., Wasserman, S., Sicherer, S., Allen, K., Muraro, A., Taylor, S., Gupta, R.S. (2017) Food Allergen Labeling and Purchasing Habits in the United States and Canada. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **5**, 345-351.

Martinis, I. (2004) Nutritivna alergija. *Medix* **52**, 86-88.

Mohammed, I., Mullett, W.M., Lai, E.P.C., Yeung, J.M. (2000) Is biosensor a viable method for food allergen detection? *Anal. Chim. Acta.* **444**, 97-102.

Monaci, L., Tregoat, V., Van Hengel, A.J., Anklam, E. (2006) Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *Eur. Food. Res Technol.* **223**, 149-179.

Monaci, L., Brohee, M., Tregoat, V., Van Hengel, A. (2011) Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. *Food Chem.* **127**, 669-675.

Monaci, L., Visconti, A. (2010) Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends Food Sci.Tech.* **21**, 272-283.

Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko-Dalmatinske županije (NZJZ Split) (2017) <<http://www.nzjz-split.hr/pdf/Alergeni%20u%20hrani.pdf>> Pristupljeno 04. Rujna 2017.

Novak, S., Badrov, T., Jurković, I., Puharić, Z., Žulec, M. (2016) Alergija na kravlje mlijeko kod djece. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo* **12**, 10-14.

Poms, R. E., Klein, C. L., Anklam, E. (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* **21**, 1-31.

Pravilnik o informiranju potrošača o nepretpakiranoj hrani (2014) *Narodne novine* **144**, Zagreb.

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

RASFF (2017) Rapid Alert System for Food and Feed <http://ec.europa.eu/food/safety/docs/rasff_annual_report_2015.pdf>. Pristupljeno 22. kolovoza 2017.

Restani, P., Ballabio, C., Di Lorenzo, C., Tripodi, S., Fiocchi, A. (2009) Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 47-56.

Sicherer, S.H., Sampson, H.A. (2010) Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 116-125.

Sicherer, S.H., Sampson, H.A. (2014) Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 291-306.

Spanjersberg, M.Q.I., Knulst, A.C., Kruizinga, A.G., Van Duijn, G., Houben, G.F. (2015) Concentrations of undeclared allergens in food products can reach levels that are relevant for public health. *Food Addit. and Contam.* **27**, 169-174.

Surojanametakul, V., Khaiprapai, P., Jithan, P., Varanyanond, W., Shoji, M., Ito, T., Tamura, H. (2012) Investigation of undeclared food allergens in commercial Thai food products. *Food Control*, **23**, 1-6.

Taylor, S.L., Baumert, J.L. (2015) Worldwide Food Allergy Labeling and Detection of Allergens in Processed Foods. *Chem Immunol Allergy.* **101**, 227-234.

Taylor, S.L., Hefle, S.L. (2006) Food allergen labeling in the USA and Europe. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **6**, 186–190.

Tolin, S., Pasini, G., Simonato, B., Mainente, F., Arrigoni, G. (2012) Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens. *Food Control.* **28**, 321-326.

Turkalj, M., Mrkić, I. (2012) Alergijske reakcije na hranu. *Lijec. Vjesn.* **134**, 168-173.

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

Ward, R.K. (2015) Introduction to food allergy. U: Handbook of Food Allergen Detection and Control (Flanagan, S., ured.) Woodhead Publishing, Cambridge/Waltham/ Kidlington, str. 1-12.

Weber, D., Raymond, P., Ben-Rejeb, S., Lau, B. (2006) Development of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method Using Capillary Liquid Chromatography and Nanoelectrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight Hybrid Mass Spectrometer for the Detection of Milk Allergens. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1604-1610.

Wood, R.A, Sicherer, S.H., Burks, A.W., Grishin, A., Henning, A.K., Lindblad, R. (2013) A phase 1 study of heat/phenol-killed, *E. coli*-encapsulated, recombinant modified peanut proteins Ara h 1, Ara h 2, and Ara h 3 (EMP-123) for the treatment of peanut allergy. *Allergy*. **68**, 803-808.

Yanagida, N., Minoura, T., Kitaoka, S. (2015) Butter Tolerance in Children Allergic to Cow's Milk. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **7**, 186-189.

Zakon o hrani (2013) *Narodne novine* **81**. Zagreb.

Zhou, S. (2007) Food labeling status of foreign countries. *World Agr.* **6**, 67-68 .

Zurzolo, G. A., Koplin, J. J., Mathai, M. L., Tang, M. K., Allen, K. J. (2013) Perceptions of precautionary labelling among parents of children with food allergy and anaphylaxis. *Med.J.* **198**, 621-623.

7. PRILOZI

Prilog 1. Upitnik

UPITNIK O MLIJEKU I PROIZVODIMA OD MLIJEKA, KAO TVARIMA ILI PROIZVODIMA KOJI UZROKUJU ALERGIJE

Poštovani,

pred Vama je kratki upitnik napravljen u svrhu izrade diplomskog rada na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Svrha upitnika je prikupiti podatke i istražiti o znanju o mlijeku i proizvodima koji mogu sadržavati mlijeko budući da se oni ubrajaju u jedne od najčešćih tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije na hranu.

Ispunjavanje ovog upitnika je anonimno te se podaci neće koristiti nigdje osim za izradu diplomskog rada.

1. Demografija

1.1. Spol:

Ž M

1.2. Dob :

- a) Studentska populacija (18-30 god)
- b) Rana odrasla dob (30-40 god)
- c) Srednja dob (40-60 god)
- d) Kasna odrasla dob (>60 god)

1.3. Obrazovanje:

- a) Osnovna škola
- b) Srednja škola
- c) Sveučilišna razina (fakultet)

1.4. Životno okruženje:

- a) Selo
- b) Grad

2. Alergije

2.1. Alergija je:

- a) intolerancija (nepodnošenje) specifične tvari
- b) bolest izazvana virusnom ili bakterijskom infekcijom
- c) prekomjerna reakcija obrambenog sustava organizma u ponovljenom doticaju sa specifičnom tvari (alergenom)
- d) neimunološki posredovana reakcija organizma

2.2. Imate li nutritivnu alergiju?

DA NE

2.3. Jeste li alergični na mlijeko?

DA NE

3. Alergeni mlijeka

3.1. Kupujete li kekse ili čajna peciva u trgovačkom lancu ili slastičarnici?

- a) Nikad
- b) Ponekad
- c) Često
- d) Uvijek

3.2. Koliko često čitate deklaraciju na proizvodima kao što su keksi ili čajna peciva?

- a) Nikad
- b) Ponekad
- c) Često
- d) Uvijek

3.3. Smatrate li da keksi ili čajna peciva mogu sadržavati tragove mlijeka?

DA NE

3.4. Smatrate li da keksi s maslacem ili čajna peciva s maslacem mogu sadržavati tragove mlijeka?

DA NE

3.5. Ukoliko na deklaraciji proizvoda kao što su keksi ili čajna peciva nema navoda o mogućoj prisutnosti mlijeka, smatrate li da taj proizvod ne sadrži tragove mlijeka?

DA NE

3.6. Ako imate ili poznajete nekoga tko ima alergiju na mlijeko, da li bi kupili keks ili čajno pecivo koje na deklaraciji ne sadrži navod o prisutnosti mlijeka?

DA NE

Hvala na ispunjavanju upitnika!