

Određivanje alergena kikirikija u uzorcima keksa i čajnih peciva imunoenzimskom metodom

Tolvajčić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:045717>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Martina Tolvajčić
979/USH

**ODREĐIVANJE ALERGENA
KIKIRIKIJA U UZORCIMA
KEKSA I ČAJNIH PECIVA
IMUNOENZIMSKOM 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, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA KEKSA I ČAJNIH PECIVA IMUNOENZIMSKOM METODOM

Martina Tolvajčić, 979 USH

Sažetak: Tijekom ovog istraživanja, imunoenzimskom ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodom analizirani su udjeli potencijalnih alergena kikirikija u 28 uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca, pekarnica i slastičarnica te su prikupljeni stavovi i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. U svih deset analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca detektirani su alergeni kikirikija, a prosječni udio iznosio je $0,37 \text{ mgkg}^{-1}$. Alergeni kikirikija detektirani su u devet od deset uzoraka keksa i čajnih peciva iz pekarnica, a njihov udio iznosio je prosječno $0,38 \text{ mgkg}^{-1}$. Prosječni udio alergena kikirikija, detektiranih u osam analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz slastičarnica, iznosio je $0,28 \text{ mgkg}^{-1}$. Rezultati ispitivanja stavova i mišljenja potrošača pokazali su da je 84,8 % ispitanika upoznato sa pojmom alergije te također 39,2 % ispitanika smatra kako se kikiriki ubraja u orašaste plodove. Od dvadeset i osam analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva, ELISA metodom detektirani su alergeni kikirikija u dvadeset sedam uzoraka pri čemu su samo dva uzorka iz trgovačkog lanca sadržavala navod o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija.

Ključne riječi: alergeni, kikiriki, ELISA, informacija o hrani

Rad sadrži: 51 stranica, 15 slika, 8 tablica, 79 literaturnih 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: *prof. dr. sc. Ksenija Marković*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Nada Vahčić
2. Prof.dr.sc. Ksenija Marković
3. Prof.dr.sc. Ines Panjkota Krbavčić
4. Doc.dr.sc. Nikolina Čukelj (zamjena)

Datum obrane: 19. srpnja 2018.

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 PEANUT ALLERGENS IN SAMPLES OF COOKIES AND TEA BISCUITS BY IMMUNOENZYMATIC METHOD

Martina Tolvajčić, 979 USH

Abstract: During this study, the content of potential peanut allergens in 28 samples of cookies and tea biscuits from supermarkets, bakeries and pastry shops was analysed by ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) method, and also the consumers opinion on peanut and peanut products as substances or products that cause allergies was examined. The presence of peanut allergens was detected in ten analysed samples of cookies and tea biscuits from supermarkets, with an average value of $0,37 \text{ mgkg}^{-1}$. Peanut allergens were detected in nine of ten samples of cookies and tea biscuits from bakeries, with an average value of $0,38 \text{ mgkg}^{-1}$. The average content of peanut allergens, detected in eight analysed samples of cookies and tea biscuits from pastry shops, was $0,28 \text{ mgkg}^{-1}$. The results of consumers attitudes and opinions showed that 84,8 % of respondents are familiar with the term of allergy and also 39,2 % of respondents consider peanuts as tree nuts. Among twenty eight analysed samples of cookies and tea biscuits by ELISA method, peanut allergens were detected in twenty seven samples of which only two from supermarkets had advisory label related to the presence of peanut allergens.

Keywords: allergens, peanut, ELISA, food information

Thesis contains: 51 pages, 15 figures, 8 tables, 79 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, Full professor

Reviewers:

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

Thesis defended: 19 July 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ALERGIJE NA HRANU.....	2
2.1.1. IgE-posredovane alergije na hranu.....	2
2.1.2. Ne-IgE posredovane stanične reakcije.....	3
2.1.3. Pojava alergijskih reakcija.....	3
2.2. KIKIRIKI KAO NUTRITIVNI ALERGEN.....	4
2.2.1. Općenito o kikirikiju.....	4
2.2.2. Alergija na kikiriki.....	6
2.2.3. Alergeni kikirikija.....	8
2.2.4. Križne reakcije.....	8
2.3. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA KIKIRIKIJA.....	9
2.3.1. Imunoanalitičke metode.....	10
2.3.2. Molekularno-genetske metode.....	11
2.4. ELISA METODA.....	12
2.4.1. Vrste ELISA testova.....	12
2.5. ZAKONSKA REGULATIVA.....	14
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. Priprema uzorka / ekstrakcija.....	19
3.2.3. ELISA test.....	19
3.2.3.1. <i>Princip određivanja</i>	19
3.2.3.2. <i>Postupak određivanja</i>	20
3.2.4. Upitnik o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije.....	22
3.2.5. Obrada podataka.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. UDIO POTENCIJALNIH ALERGENA KIKIRIKIJA ODREĐENIH ELISA TESTOM U UZORCIMA KEKSA I ČAJNIH PECIVA.....	23
4.2. STAVOVI I MIŠLJENJA POTROŠAČA O KIKIRIKIJU I PROIZVODIMA OD KIKIRIKIJA KAO TVARIMA ILI PROIZVODIMA KOJI UZROKUJU ALERGIJE...	31
5. ZAKLJUČCI	43
6. LITERATURA	44
7. PRILOZI	

1. UVOD

Alergije na hranu u značajnom su porastu u svijetu u posljednjih deset godina (Husain i Schwartz, 2013) te pogađaju oko 5 % odraslih osoba i oko 8 % djece (Sicherer i Sampson, 2014). Iako alergija može biti izazvana gotovo bilo kojom hranom, glavni alergeni odgovorni za većinu značajnih reakcija uključuju mlijeko, jaja, kikiriki, orašaste plodove, školjke, ribu, pšenicu i soju (Sicherer i Sampson, 2010).

Alergija na kikiriki je treća najčešća alergija na hranu kod male djece te najčešća alergija na hranu kod starije djece, adolescenata i odraslih osoba (Sicherer i sur., 1999). Uz značajnu prevalenciju alergije na kikiriki, ovaj je alergen u mogućnosti izazvati ozbiljne, po život opasne pa čak i smrtonosne alergijske reakcije (Perry i sur., 2004).

Najučinkovitiji način za sprečavanje pojave alergijskih reakcija je striktno izbjegavanje namirnica koje sadrže alergen, što zbog pojave križne kontaminacije hrane u proizvodnom procesu nije uvijek sigurno rješenje. Kako bi spriječili križni kontakt glavnih alergena hrane s ostalim proizvodima, mnogi proizvođači provode mjere kontrole alergena poput uporabe namjenskih objekata ili proizvodnih linija. Osim toga, proizvođači hrane nastoje putem informacija o hrani upozoriti potrošače na potencijalnu prisutnost alergena (Monaci i Visconti, 2010).

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

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

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALERGIJE NA HRANU

Alergije na hranu su rezultat pojačanog odgovora imunološkog sustava na određene komponente hrane. Komponente hrane koje mogu izazvati ove neuobičajene imunološke odgovore su najčešće tipični proteini koji se prirodno nalaze u hrani. Alergijski proteini u hrani mogu biti enzimi, inhibitori enzima, strukturni proteini ili vezujući proteini s različitim biološkim funkcijama (Martin i Chapman, 2001). Razvoj alergija na proteine hrane ovisi o strukturi proteina, količini alergena te genetskoj predispoziciji domaćina, a do senzibilizacija može doći putem probavnog sustava, dišnog sustava ili preko kože (Husain i Schwartz, 2013). Patogeneza alergije na hranu započinje fazom senzibilizacije tijekom koje organizam prepoznaje jedan ili više proteina u određenom izvoru hrane kao stranu tvar te reagira na način da počinje stvarati obrambeni imunološki odgovor. Pri ponovnom izlaganju organizma takvome izvoru hrane može doći do alergijske reakcije koja se prema prirodi imunološkog odgovora može podijeliti u dvije skupine (Boye i sur., 2012) - reakcije trenutne preosjetljivosti ili IgE-posredovane alergije na hranu i reakcije odgođene preosjetljivosti ili ne-IgE posredovane stanične reakcije (Taylor i Hefle, 2001).

2.1.1. IgE-posredovane alergije na hranu

IgE-posredovana alergija na hranu naziva se još trenutna preosjetljivost, tip 1 ili anafilaktička reakcija na hranu. IgE je jedno od pet vrsta antitijela prirodno prisutnih u ljudskom tijelu koja imaju ulogu u zaštiti organizma od različitih bolesti te su posebno značajna u borbi protiv parazitskih infekcija. Iako svi ljudi imaju nisku razinu IgE antitijela u organizmu, samo pojedinci predisponirani za razvoj alergija proizvode IgE antitijela koja specifično prepoznaju određene antigene iz okološa. Ti antigeni su tipični proteini iz prirode od kojih je samo nekolicina sposobna stimulirati proizvodnju specifičnih IgE antitijela u osjetljivih pojedinaca. Alergeni koji izazivaju proizvodnju IgE osim u hrani nalaze se također i u peludu, sporama plijesni, pčelinjem otrovu, grinjama, životinjskim dlakama (Taylor i Hefle, 2001).

Kod ovog tipa reakcija prvo mora doći do senzibilizacije od strane alergena. Kao odgovor u procesu senzibilizacije, alergen stimulira proizvodnju specifičnih IgE antitijela. Specifična IgE antitijela zatim se vežu na mastocite u različitim tkivima i bazofile u krvi. Mastociti i bazofili sadrže granule s fiziološki aktivnim supstancama koje posreduju u alergijskom odgovoru. Kod ponovnog izlaganja alergenu dolazi do njegovog vezanja za IgE antitijela na

površini membrane mastocita ili bazofila stimulirajući pritom oslobađanje medijatora u tkiva i krv domaćina. Jedan od primarnih medijatora odgovoran za mnoge trenutne simptome u ovom tipu reakcija je histamin, dok se drugi važni medijatori poput leukotriena i prostaglandina povezuju sa simptomima koji se mogu pojaviti u reakcijama tzv. kasne faze (Taylor i Hefle, 2001).

Simptomi kod ovakvog tipa reakcija se pojavljuju u roku od nekoliko minuta do jednog sata nakon unosa hrane. Mogu varirati od blagih i uznemirujućih do težih i po život opasnih, a mogu uključivati probavni sustav, kožu ili dišni sustav. Gastrointestinalni simptomi uključuju mučninu, povraćanje, dijareju, bolove u trbuhu, grčeve. Neki od kožnih simptoma su osip, ekcem, angioedem, svrbež, a respiratorni simptomi mogu uključivati rinitis te astmu. Također kao posljedica ovakvog tipa alergijske reakcije može doći do sniženja krvnog tlaka, edema grkljana te anafilaktičkog šoka (Taylor i Hefle, 2001).

2.1.2. Ne-IgE posredovane stanične reakcije

Ne-IgE posredovane stanične alergije na hranu uključuju interakciju između specifičnih antigena ili alergena iz hrane i T stanica vezanih na tkiva koje prilikom senzibilizacije oslobađaju upalne medijatore citokine i limfokine što rezultira lokalnim upalnim procesima (Taylor i Hefle, 2001; Taylor, 2006).

Kod ovog tipa reakcija simptomi se počinju javljati 6-24 sata nakon unosa hrane. Reakcije se razvijaju polako dostižući maksimum otprilike 48 sati nakon unosa, a zatim kroz 72-96 sati polagano opadaju. Izuzev celijakije kao bolesti koja uključuje neuobičajen imunološki odgovor na pšenicu i srodne žitarice, uloga odgođenih reakcija preosjetljivosti na hranu ostaje nedovoljno razjašnjena (Taylor i Hefle, 2001).

2.1.3. Pojava alergijskih reakcija

Alergija na hranu predstavlja javnozdravstveni problem posebno u razvijenim zemljama, a tijekom posljednjih nekoliko desetljeća bilježi porast te predstavlja važan izazov za kliničku alergologiju i prehrambenu industriju (Besler, 2001).

Za mali postotak stanovništva konzumacija određene hrane čak i u malim količinama može rezultirati po život opasnim alergijskim reakcijama. Oko 4-8 % djece i 2-4 % odraslih osoba u razvijenim zemljama pate od alergija na hranu (Boye i sur., 2012). Najčešće se pojavljuju kod male djece i kod pojedinaca s osobnom ili obiteljskom povijesti atopijskih bolesti. Većina djece prevlada alergije na hranu koju mogu ponovno nesmetano unositi kada su starija (Al-

Muhsen i sur., 2003). Istraživanja su pokazala da do 80 % dojenčadi s alergijom na jaja mogu jesti jaja od pete godine te da je do 85 % djece s alergijom na kravlje mlijeko tolerantno na njega iznad tri godine starosti (Dannaeus i Inganäs, 1981). Opažena prevalencija alergija na hranu značajno je veća od stvarne prevalencije pri čemu do 30 % stanovništva vjeruje da ima alergiju na hranu i do 30 % roditelja misli da njihova djeca imaju alergiju na hranu (Al-Muhsen i sur., 2003).

U nekim slučajevima količine alergena čak i u tragovima imaju sposobnost izazvati alergijsku reakciju, a zabilježene količine iznosile su između 150 µg i 100 mg unesene hrane. Najniže doze koje mogu izazvati alergijske simptome u DBPCFS (engl. *Double-Blind, Placebo-Controlled Food Challenge*) studijama iznosile su 4 mg kikirikija, 6 mg bakalara i 50 mg bjelanjka jajeta. Kratkotrajni, subjektivni simptomi pojavili su se nakon uzimanja 100 µg proteina kikirikija, a ozbiljne sistemske reakcije bile su izazvane unosom 5 mg proteina kikirikija (Besler, 2001).

Iako je poznato da preko 170 vrsta hrane uzrokuje alergije, devet namirnica se danas smatra glavnim izvorima alergena koji uzrokuju više od 90 % svih alergijskih reakcija na hranu. Te namirnice uključuju mlijeko, jaja, soju, kikiriki, orašaste plodove, plodove mora, žitarice koje sadrže gluten, sezam i gorušicu (Boye i sur., 2012). Sve alergije na hranu mogu izazvati anafilaksiju, a one koje ju najčešće uzrokuju su alergije na kikiriki, orašaste plodove, ribu i školjke, među kojima se izdvajaju kikiriki i orašasti plodovi koji su odgovorni za glavninu ozbiljnijih posljedica (Al-Muhsen i sur., 2003).

2.2. KIKIRIKI KAO NUTRITIVNI ALERGEN

2.2.1. Općenito o kikirikiju

Biljka kikiriki (lat. *Arachis hypogea*) pripada botaničkoj porodici Leguminosae, koja uključuje zeleni grašak, leću, soju i grah. Kikiriki su jednogodišnje samooprašujuće biljke, a plodovi kikirikija se dobivaju povlačenjem mahuna iz zemlje (Wen i sur., 2007). Sjeme se u početku razvija na granama biljke koje se s porastom težine počinju savijati prema tlu te se pod zemljom razvijaju mahune gdje dozrijevaju prije berbe (Hourihane, 2011). Uobičajeno je da mahuna sadrži 2 do 3 sjemena ovalnog oblika, a svako sjeme sadrži dva režnja. Kikiriki potječe iz Južne Amerike prije oko 4000 do 5000 godina, prenijet je u Afriku, a zatim u Sjevernu Ameriku za vrijeme trgovine robovima. U SAD-u su najpoznatije sorte kikirikija

Virginia, Španjolski, Valencia i Runner. Doneseni su u Europu zahvaljujući španjolskim istraživačima te se brzo proširili po cijelom svijetu (Wen i sur., 2007).

Prosječni sadržaj proteina među različitim varijetetima kikirikija iznosi oko 25 %, na što ima utjecaj genotip te sezonske značajke (Ahmed i Young, 1982; Holaday i Pearson, 1974). Među varijetetima kikirikija prosječan sadržaj ulja iznosi 44-56 % (Ahmed i Young, 1982), koje je pretežito smješteno u kotiledonima, a manjim dijelom u klici i sjemenoj lupini (Woodroof, 1983). Ulje kikirikija sastoji se od različitih glicerida od kojih je otprilike 80 % nezasićenih i 20 % zasićenih masnih kiselina (Cobb i Johnson, 1973). Nezasićene masti pretežito potječu od oleinske kiseline (43-65 %) te polinezasićene linolne kiseline (20-37%) (Mottern, 1973). Postoje razlike u sadržaju i sastavu ulja kikirikija kod različitih varijeteta kikirikija. Udjel ugljikohidrata je oko 19 %, od čega 0,5-5 % otpada na škrob, 4-7 % na saharozu te 2 % na celulozu. Udjel vlage u sirovom kikirikiju iznosi od 5 do 7 %, te se smanjuje tijekom prženja na ispod 2 % čime se usporava kvarenje (Woodroof, 1983). Od mineralnih tvari su najzastupljeniji fosfor, kalcij, magnezij i kalij, a također su dobar izvor vitamina poput vitamina B skupine, E i K (Asibuo i sur., 2008). Boja sjemene lupine potječe od tanina i kateholnih komponenata (Ahmed i Young, 1982), dok boja kotiledona te ulja od kikirikija potječe od karotenoida, uključujući lutein i β -karoten (Pattee i Purcell, 1967). Koncentracija karotenoida se smanjuje s povećanjem zrelosti, što je vjerojatno posljedica povećanja sadržaja ulja (Pattee i sur., 1969). Boja pečenog kikirikija primarno potječe od Maillardovih reakcija u kojima reagiraju šećeri s aminima, a u manjoj mjeri i od karamelizacije šećera (Mason i sur., 1966). Crvene ovojnice kikirikija sadrže tanin, tiamin i leuko-antocijanin (Stansbury i sur., 1950).

Kikiriki je cijenjen izvor lako probavljivih proteina te ima veliku primjenu kako u prehrambenoj, tako i u ostalim industrijama poput proizvodnje plastike, linoleuma, ljepila, izbjeljivača i šampona (Husain i Schwartz, 2013). Kikiriki se prerađuje i koristi na različite načine, što ga čini jednim od najsvestranijih usjeva. Prednosti korištenja kikirikija kao sastojka uključuju ugodnu aromu i miris, hrskavu teksturu, visoki udjel proteina, energije i mineralnih tvari te sposobnost skladištenja i isporuke bilo gdje u svijetu. Potrošnja kikirikija se javlja u različitim oblicima, poput konzerviranog, prženog u ulju, suho prženog, slanog, kuhanog, tostiranog, maslaca od kikirikija i biljnog ulja (McWatters, 1983). U razvijenim zemljama kikiriki se uglavnom koristi za proizvodnju maslaca od kikirikija te se konzumira kao pržen ili u konditorskim proizvodima, dok se u nekoliko zemalja u razvoju uglavnom prerađuje u ulje (Jambunathan, 1991). Kolač dobiven nakon ekstrakcije ulja predstavlja dobar

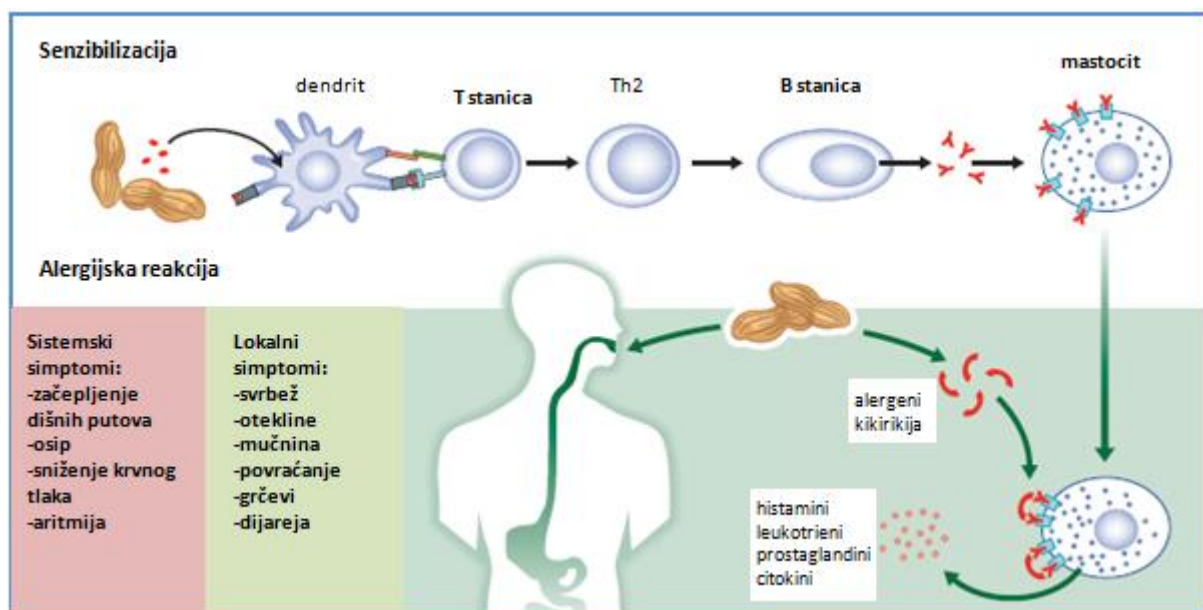
izvor proteina te ima nekoliko primjena kao hrana za životinje i u hrani za dojenčad (Asibuo i sur., 2008).

2.2.2. Alergija na kikiriki

Alergija na kikiriki prepoznata je kao vrlo zabrinjavajuća preosjetljivost na hranu odgovorna za ozbiljne alergijske reakcije kod djece, adolescenata te odraslih osoba (Sampson i sur., 1992). Štoviše, kikiriki i proizvodi na bazi kikirikija češće su uzrok smrtonosnih anafilaktičkih šokova u odnosu na ostale prehrambene proizvode (Bock i sur., 2001). Senzibilizacija na kikiriki obično se javlja tijekom ranog djetinjstva i vrlo često ostaje tijekom cijelog života (Bock i Atkins, 1989), iako se pokazalo da ju neki pojedinci uspiju prevladati (Hourihane i sur., 1998). Izuzetno male količine proteina kikirikija mogu izazvati subjektivne i objektivne simptome u odnosu na sadržaj proteina u kikirikiju koji iznosi 200 mg. Subjektivni simptomi mogu se pojaviti nakon unosa doze manje od 100 µg, dok se objektivni simptomi mogu pojaviti nakon unosa doze od 2 mg (Husain i Schwartz, 2012). Općenito se smatra da su alergijske reakcije na kikiriki stečene nakon primarne senzibilizacije kroz probavni sustav. Otprilike oko 75 % alergijskih reakcija na kikiriki kod djece javlja se pri prvoj izloženosti što se djelomično može objasniti senzibilizacijom tijekom trudnoće, kroz dojenje, izloženost kože ulju kikirikija te serološkom križnom reaktivnošću s alergenima drugih mahunarki (Mittag i sur., 2004). U tom smislu, alergija na kikiriki se razlikuje od ostalih alergija na hranu, poput npr. alergije na proteine mlijeka ili jaja, koji prevladavaju kod djece, ali obično nestaju u odrasloj dobi (Bock, 1985). Do sada se strogo izbjegavanje kikirikija i proizvoda koji sadrže kikiriki pokazalo kao najbolji način za sprječavanje alergijskih manifestacija u osjetljivih pojedinaca. Međutim, proteini kikirikija često se pojavljuju kao skriveni alergeni u mnogim (neodgovarajuće označenim) prehrambenim proizvodima te je slučajnu potrošnju takve hrane vrlo teško izbjeći (Barre i sur., 2005a).

Uzrok povećane prevalencije alergije na kikiriki za sada je još uvijek nedovoljno poznat. Iako genetski i okolišni čimbenici zasigurno imaju utjecaj, također se kao uzrok povećanja alergija navodi smanjena izloženost specifičnim virusnim infekcijama i endotoksinima u ranijoj dobi (Nowak-Wegrzyn, 2006) te izloženost kikirikiju tijekom trudnoće i laktacije kao i prvi susret s kikirikijem kod dojenčadi ili djece. Drugi čimbenici koji mogu igrati ulogu su povećana konzumacija kikirikija, korištenje ne-prehrambenih proizvoda koji sadrže kikiriki te rana izloženost proteinima koji imaju potencijalnu križnu reaktivnost poput soje ili rogača (Husain i Schwartz, 2012).

Unatoč njegovoj velikoj popularnosti, javljaju se dva sigurnosna pitanja vezana uz sigurnost konzumacije kikirikija. Jedan je kontaminacija aflatoksinom, koji proizvode plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*. Aflatoksin je kancerogen i također je povezan s mentalnom zaostalošću (Yu i sur., 2003). Na sreću, odgovarajuće metode skladištenja i rukovanja mogu u potpunosti eliminirati rizik kontaminacije aflatoksinom (Boutrif, 1995). Drugi problem koji se javlja veže se uz alergičnost kikirikija. Do manifestacije alergijske reakcije dolazi u sljedećih nekoliko koraka: prezentacija antigena, proizvodnja IgE antitijela, aktivacija mastocita, otpuštanje medijatora upale te u konačnici ispoljavanje simptoma (Wen i sur., 2007) (Slika 1).



Slika 1. Mehanizam alergijske reakcije na kikiriki (prema Burks, 2008)

Inicijalno izlaganje antigenu poznato je kao faza senzibilizacije u kojoj ne dolazi do pojavljivanja simptoma, već se u većim količinama proizvode specifična IgE antitijela koja se mogu vezati za antigen. Ponovna izloženost antigenu uzrokuje degranulaciju mastocita, bazofila i eozinofila što rezultira oslobađanjem leukotriena, prostaglandina i drugih medijatora. Upalne reakcije uzrokovane imunološkim posrednicima razlikuju se po težini, a mogu uključivati osjećaj trnaca oko usta, urtikariju, rinitis, astmu, anafilaktički šok i smrt u roku od sat vremena izloženosti (Chang i sur., 2013).

Pored izloženosti kikirikiju, razvoj alergije na kikiriki također ovisi o načinima pripreme kikirikija (Beyer i sur., 2001). Alergija na kikiriki obično se podrazumijeva kao bolest

razvijenih zemalja gdje ljudi obično konzumiraju pečeni kikiriki (Hourihane, 2002). Za razliku od toga, alergija na kikiriki je manje učestala u Kini gdje ljudi konzumiraju slične količine kikirikija koji se kuha ili prži. Pečenje može povećati količinu završnih proizvoda glikozilacije koji su otporniji na djelovanje kiseline te su povezani s povećanjem alergnosti pečenog kikirikija (Chung i Champagne, 2001). Za razliku od pečenja, kuhanje uzrokuje dvostruko smanjenje alergnosti kikirikija vjerojatno zbog uklanjanja alergena niske molekulske težine iz kikirikija u vodu tijekom kuhanja (Wen i sur., 2007).

Također, sirovo ulje kikirikija može sadržavati alergene proteine kikirikija za razliku od rafiniranog ulja. U istraživanju provedenom *in vivo*, samo je šest od 60 pojedinaca sa alergijom na kikiriki reagiralo na sirovo ulje kikirikija, ali nijedna osoba nije imala alergijsku reakciju na rafinirano ulje kikirikija (Hourihane i sur., 1997).

2.2.3. Alergeni kikirikija

Primarni alergeni kikirikija su proteini kotiledona, a do danas je identificirano 8 alergena kikirikija Ara h 1 - Ara h 8 (Husain i Schwartz, 2013). Plod kikirikija sadrži u prosjeku 29 % proteina pri čemu oko 20 % od ukupnih proteina čini glavni protein Ara h 1 (vicilin-sličan protein), molekulske mase 63-64 kD. Drugi glavni protein Ara h 2 (koglutin- sličan protein) čija molekulska masa iznosi oko 17 kD, čini oko 10 % ukupnog sadržaja proteina kikirikija. Ostali alergeni kikirikija su Ara h 3 i 4 (proteini glicinina), Ara h 5 (profilin), Ara h 6 i 7 (koglutin- slični proteini) i Ara h 8 (Hefle, 2006).

Od najveće važnosti među njima su Ara h 1 i Ara h 2 obzirom da serum IgE kod > 90 % pojedinaca osjetljivih na kikiriki prepoznaje upravo ova dva alergena dok 45-95 % osoba alergičnih na kikiriki ima IgE antitijela za srodni protein Ara h 3 (Husain i Schwartz, 2012).

2.2.4. Križne reakcije

Zabilježene su križne reakcije između kikirikija i drugih mahunarki, tj. soje, graška graha i leće kod otprilike 5 % pacijenata alergičnih na kikiriki (Bernhisel-Broadbent i sur., 1989). Pokazalo se da alergeni Ara h 1 iz kikirikija, Len c 1 iz leće i Pis s 1 iz graška dijele zajedničke epitope što bi mogao biti uzrok križne reaktivnosti između tih mahunarki (Barre, 2005b). U slučaju križnih reakcija između leće i kikirikija, pokazalo se da alergen leće Len c 1,02 ima podudarnost s više od 50 % aminokiselinskih sekvenci s glavnim alergenom kikirikija Ara h 1 i sa sojom, koji pripadaju porodici vicilina (Lopez-Torrejon i sur., 2003). Soja glicinin G1 kiselinski lanac dijeli slične IgE epitope s alergenom kikirikija Ara h 3, a

sličnost ove sekvence je 62-72 % među glicininima kod Ara h 3, soje i graška (Kumar Verma i sur., 2012).

Uz navedene mahunarke, lupina isto tako pokazuje visok stupanj križne reaktivnosti s kikirikijem, stoga je rizik povezan s križnim reakcijama također visok. To potvrđuje činjenica da alergen Lup an 1 iz lupine ima homolognu sekvencu s Ara h 1 alergenom iz kikirikija (Kumar Verma i sur., 2012). U Francuskoj i Belgiji izviještena je prevalencija alergije na lupine koja je pokazivala križnu osjetljivost na kikiriki. U istraživanju koje je uključivalo 5366 pacijenata zapažena je značajna križna reaktivnost između kikirikija i brašna od lupine. Istraživanje je pokazalo da je 14,5 % odraslih i 17 % djece alergičnih na kikiriki imalo križnu osjetljivost na lupine (Gayraud i sur., 2009). U Danskoj je osjetljivost na lupine utvrđena u 82 % od 39 pacijenata alergičnih na kikiriki, od kojih je 35 % pokazivalo klinički relevantne simptome nakon provedenog ispitivanja (Peeters i sur., 2009). Prema Moneret-Vautrin i suradnicima (1999) rizik pacijenata alergičnih na kikiriki koji reagiraju na lupine sa simptomima alergije iznosi 28 % (Jappe i Vieths, 2010).

Križna reaktivnost između kikirikija i orašastih plodova pokazala se u 25-50 % slučajeva. To potvrđuje činjenica da glavni alergen kikirikija Ara h 2 dijeli IgE vezujuće epitope s alergenima badema i brazilskog oraha, što povećava učestalost senzibilizacije na orašaste plodove kod osoba alergičnih na kikiriki (Kumar Verma i sur., 2012).

Istraživanja su pokazala da se razvoj alergije na kikiriki može pojaviti nakon primarne senzibilizacije s peludom breze putem dišnog sustava te da je u križne reakcije uključen glavni alergen breze Bet v 1, koji je homologan alergenu kikirikija Ara h 8 (Mittag i sur., 2004).

2.3. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA KIKIRIKIJA

Zbog velike upotrebe hrane koja sadrži kikiriki, nepravilnog označavanja ili kontaminacije sirovina i proizvodnih linija postoji mogućnost pojave tragova kikirikija u hrani u kojoj se to ne očekuje. Ova činjenica predstavlja potencijalnu opasnost za pojedince alergične na kikiriki (Wen i sur., 2007). Stoga su potrebne pouzdane metode detekcije za alergene kikirikija radi osiguranja usklađenosti označavanja hrane te poboljšanja zaštite potrošača. Međutim, otkrivanje alergena u hrani može biti vrlo teško budući da su često prisutni u tragovima te mogu biti maskirani matriksom hrane (Poms i sur., 2004). Postoji opća suglasnost da se granice detekcije za alergene u različitoj hrani trebaju nalaziti između 1 i 100 mgkg⁻¹. Osim

osjetljivosti, specifičnost je još jedan uvjet za razvoj testova za otkrivanje alergena hrane (Wen i sur., 2007).

2.3.1. Imunoanalitičke metode

Primjenjuje se nekoliko analitičkih metoda za detekciju skrivenih proteina kikirikija ili alergena (Tablica 1). One su usmjerene na određivanje proteina kikirikija ili na DNK fragmente koji kodiraju za alergene kikirikija (Wen i sur., 2007). Metodama koje su usmjerene na određivanje proteina mogu se odrediti ukupni proteini kikirikija ili njegovi specifični alergeni. U tu svrhu mogu se primijeniti: dot-imunološko blotanje (engl. *dot immunoblotting*), „rocket“ imunoelektroforeza (engl. *Rocket Immuno-Electrophoresis*, RIE), imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), radioalergosorbent test (engl. *Radio-Allergosorbent Test*, RAST), radioimunotest (engl. *Radio-Immunoassay*, RIA), imunokromatografski test (engl. *dipsticks*), lateralni protočni test (engl. *Lateral-Flow Immunoassay*, LFIA) te tekućinska kromatografija i višestruka spektrometrija masa (engl. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS). Imunološko blotanje, imunokromatografski test, RIE i LFIA daju samo kvalitativne ili semi-kvantitativne rezultate, dok su ELISA, RAST, RIA i LC-MS/MS kvantitativne metode (Poms i sur., 2004). Imunoanalitičke metode se uglavnom odabiru prema specifičnosti i osjetljivosti antitijela te se koriste u prehrambenoj industriji, istraživačkim laboratorijima i vladinim organizacijama za otkrivanje i kvantificiranje prisutnosti alergena u hrani (Poms i sur., 2004). Većina metoda koje su usmjerene na određivanje proteina pripada imunološkim metodama koje se temelje se na reakciji antigen-antitijelo, a ključni je korak izbor odgovarajućeg izvora antitijela. Prvi izvor antitijela bio je serumski IgE senzibiliziranih pacijenata (Keating i sur., 1990), koji se zbog etičkih razloga i visokog stupnja varijacije uslijed individualnosti pacijenata ne primjenjuje u komercijalnim testovima. Stoga se za razvoj testova zamjenjuju poliklonskim antitijelima (IgE) kunića, ovaca ili koza i monoklonskim antitijelima miševa. Na temelju tipova analita ovi se testovi mogu dalje podijeliti u dvije skupine: testovi za otkrivanje proteina i testovi za ispitivanje alergena (Krska i sur., 2004). Testovi za ispitivanje alergena usmjereni su na specifičan alergen kikirikija, dok testovi za otkrivanje proteina detektiraju sveukupne proteine kikirikija. Stoga testovi za otkrivanje proteina mogu detektirati širi raspon proteina na nižim razinama. Među testovima za otkrivanje proteina, ELISA je najčešće korištena metoda zbog visoke preciznosti, lakoće rukovanja te dobrog potencijala za standardizaciju (Wen i sur., 2007).

Tablica 1. Najčešće korištene metode za analizu alergena u hrani (EFSA, 2014)

Analiza proteina		Analiza DNA
Fizikalno-kemijske metode	Imunološke metode	PCR*** metode
(1D/2D) SDS*elektroforeza HPLC** Kapilarna elektroforeza Masena spektrometrija	ELISA Imunološko blotanje „Rocket“ imunoelektroforeza (RIE) Lateralni protočni test (LFIA) Imunokromatografski test Dot-imunološko blotanje Proteinski biosenzori Proteinski mikročipovi	<i>End-point</i> PCR <i>Real-time</i> PCR PCR-ELISA DNA biosenzori DNA mikročipovi

* SDS (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate*)

** HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

*** PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

2.3.2. Molekularno-genetske metode

Otkrivanje alergena u hrani pomoću metoda koje se temelje na detekciji proteina može ponekad biti teško obzirom da su vrlo često prisutni u malim količinama i maskirani matriksom hrane. Molekularno-genetske metode pojavile su se kao alternativne i komplementarne metode za otkrivanje alergena gdje uobičajene metode za otkrivanje alergena na temelju proteina nisu dovoljno učinkovite. Ove metode također karakterizira visoka preciznost i specifičnost, a općenito imaju bolju sposobnost podnošenja nepovoljnih procesnih uvjeta u odnosu na alergene proteine (Mustorp i sur., 2008). Temelje se na umnažanju specifične molekule DNK pomoću lančane reakcije polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Nedostatak ovih metoda je u tome što neka hrana može sadržavati DNK koja je djelomično ili potpuno denaturirana što posljedično može dati lažno negativne rezultate, a uz to neke komponente hrane mogu smanjiti učinkovitost umnožavanja DNK. Molekularno-genetske metode su u odnosu na ELISA metode relativno složenije jer zahtijevaju više opreme te imaju dulje protokole pa se stoga smatraju nepraktičnima za rutinske analize. Osjetljivost DNK-testova jako ovisi o količini i kvaliteti kalupa DNK budući da DNK koja kodira alergen u uzorcima hrane može biti prisutna u malim količinama te se može razoriti tijekom procesa obrade (Holzhauser i sur., 2006). Ovakve metode mogu biti poželjne u regulatornim agencijama i institucijama koje su opremljene odgovarajućom opremom. Trenutno se koriste tri pristupa metoda na temelju DNK za otkrivanje alergena u hrani: PCR u kombinaciji sa gel-elektroforezom, PCR u kombinaciji sa ELISA-om i RT-PCR (engl. *Real-Time* PCR) (Boye i sur., 2012).

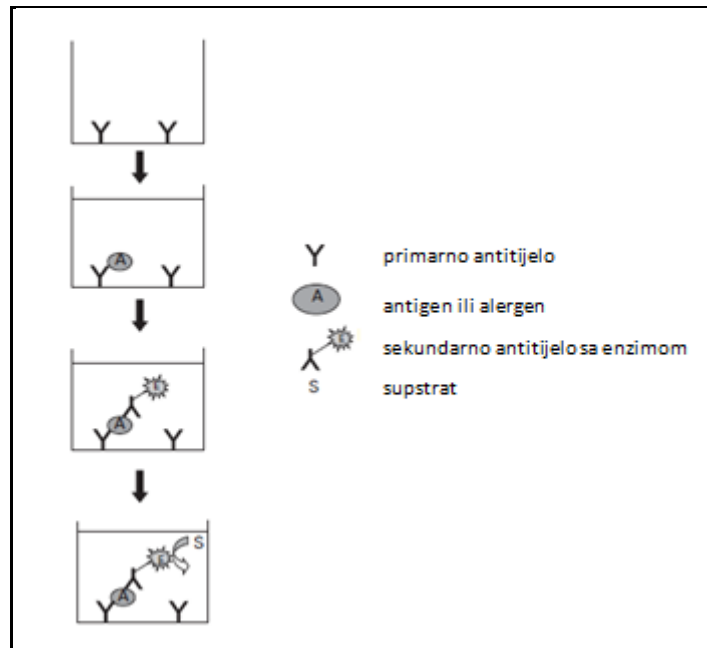
2.4. ELISA METODA

Među sve većim brojem tehnika za detekciju alergena hrane, ELISA je postigla značajnu važnost i postala najčešće korištena metoda zbog svoje visoke osjetljivosti i specifičnosti, dostupnosti automatizacije i jednostavnosti korištenja. Neke ELISA-e su dizajnirane za otkrivanje specifičnih alergena (npr. BLG, Ara h1, tropomiozin škampa), dok druge ELISA-e detektiraju smjese proteina iz alergenog izvora (npr. mlijeko, jaja, kikiriki, topljivi proteini badema) (Taylor i sur., 2009). Detekcija se temelji na vezanju alergena ili specifično obilježenog proteina s antitijelom specifično proizvedenim da prepozna i veže te proteine. Ovaj vezujući kompleks se vizualizira kolorimetrijskim testom kada enzimi, s kojima su obilježena alergen specifična antitijela, reagiraju s otopinom supstrata. Koncentracija alergena može se kvantificirati dobivanjem vrijednosti optičke gustoće pomoću čitača mikroploča i iscertavanja vrijednosti pomoću standardne krivulje (Boye i sur., 2012).

2.4.1. Vrste ELISA testova

a) „*Sandwich*“ ELISA test

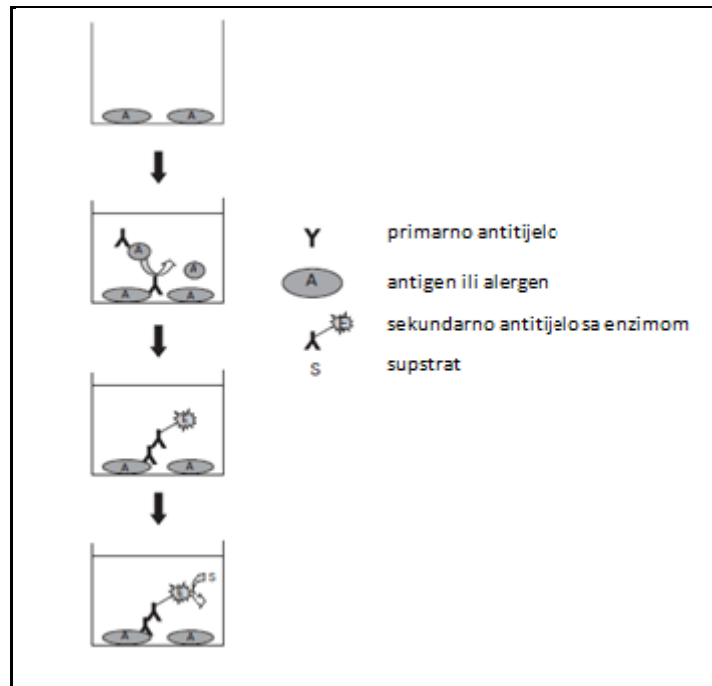
„*Sandwich*“ ELISA je osjetljivi test kojim je moguće detektirati i kvantificirati koncentracije specifičnih topljivih proteina (Slika 2). Ovaj test je specifičniji imunoenzimski test u odnosu na konkurentni obzirom da zahtijeva antitijela usmjerena na dva ili više zasebna epitopa. Osnovna „*sandwich*“ ELISA metoda koristi visoko pročišćena, specifična antitijela (hvatajuća antitijela) u suvišku koja su adsorbirana na plastičnu podlogu. Imobilizirana antitijela služe kako bi specifično vezala odgovarajuće antigene, kao što su alergeni hrane, koji su prisutni u uzorku. Nakon ispiranja nevezanog materijala, vezani antigeni se detektiraju pomoću antitijela spojenih s enzimima (detektirajuća antitijela). Potom slijedi dodatak kromogene otopine koja sadrži supstrat, a udio obojenog produkta nastalog vezanjem antitijela povezanih s enzimima može se jednostavno izmjeriti spektrofotometrijski pri određenoj valnoj duljini. Rezultati „*sandwich*“ ELISA testa mogu biti kvantificirani u odnosu na baždarni pravac. Intenzitet promjene boje je proporcionalan koncentraciji alergena u uzorku, odnosno što je intenzivnija promjena boje, to je viši udio alergena u uzorku (Yeung, 2006).



Slika 2. Shematski prikaz „sandwich“ ELISA testa (Yeung, 2006)

b) Konkurentni ELISA test

Konkurentni inhibicijski ELISA test koristi pristup prepoznavanja jednog epitopa od strane antitijela u alergenom ostatku u uzorku (Slika 3). U konkurentnom testu na podlozi se nalazi antigen, a na nju se dodaje otopina koja sadrži ograničeni udio primarnih antitijela te antigena ili analita. Test se bazira na principu da će se antigen iz uzorka vezati na antitijelo i pritom konkurirati vezanju antigena iz podloge za antitijelo. Nakon što se nevezana primarna antitijela isperu, dodaju se sekundarna antitijela povezana s enzimom kako bi se detektirali antigen/antitijelo kompleksi. Potom se dodaje supstrat za enzime. Kod ove metode intenzitet nastale boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji analita, odnosno što je intenzivnija boja, to je niža koncentracija alergena u uzorku (Yeung, 2006). Konkurentni ELISA test je poznat po svojoj sposobnosti da detektira relativno male proteine (Poms i sur., 2004). Danas, kontinuiranim razvojem tehnologije omogućeno je enzimsko označavanje analita ili specifičnog antitijela analita (Boye i sur., 2012).



Slika 3. Shematski prikaz konkurentnog ELISA testa (Yeung, 2006)

2.5. ZAKONSKA REGULATIVA

U Hrvatskoj se od 13. prosinca 2014. godine obavezno primjenjuje Uredba (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani (Uredba, 2011). Cilj te Uredbe bio je pojednostaviti postojeće propise o označavanju hrane radi jedinstavne primjene te omogućiti izbor hrane koji odgovara prehrambenim potrebama pojedinaca. Podatke o tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije ili netolerancije, a koji između ostalog uključuju kikiriki i proizvode od kikirikija, potrebno je navesti u okviru obveznih informacija o hrani. Pod pojmom informacije o hrani podrazumijevaju se 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 (Uredba, 2011). Označavanje hrane je vrlo važno u komunikaciji subjekta u poslovanju s hranom s potrošačima jer mora u potpunosti informirati potrošače o hrani koju konzumiraju te zaštititi njihovo zdravlje i interese.

Označavanje prehrambenih proizvoda o prisutnosti alergeni sastojaka danas predstavlja najučinkovitiji način prevencije kako bi se izbjeglo gutanje “skrivenih” alergena od strane osjetljivih pojedinaca. Neki od razloga pojavljivanja nedeklariranih ili “skrivenih” alergena u hrani uključuju pogreške kod formulacija i pakiranja, neprijavljenu upotrebu prerađevina ili

ostataka, prisutnost sastojaka dobivenih iz alergijskih izvora ili upotrebu zajedničke opreme i objekata (Hefle i sur., 2007). Trenutni propisi o označavanju ne pokrivaju kontaminacije alergenima prehrambenih proizvoda nastale križnim kontaktom te zbog toga određivanje alergena u hrani predstavlja glavnu brigu kako za prehrambenu industriju, tako i za alergične pojedince. Testiranja na prisutnost alergena trebaju imati određeno mjesto u HACCP (engl. *Hazard Analysis Critical Control Points*) planovima i planovima kontrole alergena (Besler, 2001).

Zbog straha od “skrivenih” alergena potrošači s alergijom na hranu su sve više počeli tražiti informacije vezane uz korištenje zajedničke opreme i objekata. Kao odgovor, prehrambena industrija je dobrovoljno počela uključivati oznake o predostrožnosti na pretpakiranoj hrani kao nadopunu popisu sastojaka. Oznake su koristile brojne oblike, a 3 najpopularnija su: “Može sadržavati [alergen]”, “Proizvedeno na zajedničkoj opremi s [alergenom]”, “Proizvedeno u istom objektu s [alergenom]”. Iz razloga što su ovakve savjetodavne oznake dobrovoljne, koristi se mnogo različitih verzija te kriteriji upotrebe variraju među različitim prehrambenim industrijama (Hefle i sur., 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja prikupljeno je i analizirano 28 uzoraka keksa i čajnih peciva, od kojih je 10 prikupljeno u objektima trgovačkih lanaca, 10 u pekarnicama i 8 u slastičarnicama na zagrebačkom tržištu. Uzorci iz trgovačkih lanaca označeni su oznakama KT₁ do KT₁₀, uzorci iz pekarnica KP₁ do KP₁₀ te uzorci iz slastičarnica KS₁ do KS₈.

3.1.2. Ispitanici

U svrhu prikupljanja stavova i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije, proveden je upitnik (Prilog 1) na uzorku od 79 ispitanika starijih od 18 godina koji su dobrovoljno pristali sudjelovati u provedenom anketiranju.

3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor

Tijekom provedbe istraživanja korišteni su sljedeći uređaji:

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



Slika 4. Centrifuga



Slika 5. Čitač mikrotitarskih pločica

Korišteno je sljedeće posuđe i pribor:

- mlin za usitnjavanje
- automatska pipeta
- nosač za mikrojažice, AgraQuant, Romer Labs, Austrija
- pipeta od 10 mL
- pipeta od 1 mL
- nastavak za pipetu
- Falcon epruvete
- Erlenmeyerove tikvice
- stakleni lijevci
- filter-papir
- odmjerna tikvica od 200 mL
- odmjerna tikvica od 100 mL
- odmjerna tikvica od 10 mL
- laboratorijska čaša od 100 mL
- laboratorijska čaša od 250 mL
- metalni stalak za epruvete

- staničevina
- špatula

3.1.4. Reagensi

- AgraQuant, Peanut, Extraction & Sample Dilution Buffer, Romer Labs, Austrija (ekstrakcijski pufer)
- AgraQuant, Peanut, Wash Buffer, Romer Labs, Austrija (pufer za ispiranje)
- AgraQuant-Peanut Enzyme, Romer Labs, Austrija (reagens sa zelenim poklopcem, konjugat) (Slika 6)
- AgraQuant-Substrate, Romer Labs, Austrija (reagens s plavim poklopcem) (Slika 6)
- AgraQuant-Stop Solution, Romer Labs, Austrija (reagens s crvenim poklopcem) (Slika 6)
- Filtrat pročišćenog uzorka.



Slika 6. Reagensi iz seta za ELISA test

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema reakcijskih otopina

Otopina ekstrakcijskog pufera pripremljena je razrjeđivanjem koncentrata iz seta za ELISA test s destiliranom vodom u omjeru 1:10, a otopina pufera za ispiranje pripremljena je također razrjeđivanjem koncentrata iz seta za ELISA test s destiliranom vodom u omjeru 1:10. Pripremljene otopine pufera čuvane su pri temperaturi od 4 °C. Tako pripremljene otopine, neposredno prije upotrebe, izvade se iz hladnjaka kako bi se temperirale i mogle koristiti.

3.2.2. Priprema uzorka / ekstrakcija

U plastičnoj epruveti na analitičkoj vagi izvagano je 1,0000 g prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka, nakon čega je dodano 20 mL razrijeđenog ekstrakcijskog pufera i sve zajedno vorteksirano do potpune homogenizacije uzorka u ekstrakcijskom puferu. Takva suspenzija inkubirana je petnaest minuta u prethodno zagrijanoj vodenoj kupelji pri 60 °C uz snažno protresanje svake dvije minute. Suspenzija je zatim centrifugirana 10 minuta na 2000 okretaja/min kako bi se dobio bistri supernatant. Obzirom da su u supernatantu nakon centrifugiranja bile prisutne čestice, bilo ga je potrebno profiltrirati, a dobiveni filtrat je sakupljen za određivanje udjela potencijalnih alergena kikirikija ELISA metodom.

3.2.3. ELISA test

3.2.3.1. Princip određivanja

U ovom istraživanju korišten je AgraQuant kikiriki test koji prema tehnici određivanja pripada „sandwich“ ELISA testu. Proteini kikirikija se iz uzorka ekstrahiraju pomoću ekstrakcijskog pufera, a primarna antitijela su u tankom sloju nanosena na površinu mikrojažica. Nanošenjem ekstrahiranih uzoraka (ili standarda za potrebe izrade baždarne krivulje) u mikrojažice, dolazi do vezanja proteina kikirikija i antitijela. Nakon provedenog koraka ispiranja, u mikrojažice se dodaje enzimom obloženo sekundarno antitijelo te određeno vrijeme inkubira. Ponovno slijedi korak ispiranja i dodavanje supstrata za enzim pri čemu dolazi do razvitka plave boje. Karakteristika ovog testa je da je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji proteina kikirikija u uzorku (ili standardu). Nakon određenog vremena u mikrojažice (Slika 7) se dodaje „stop“ otopina pri čemu dolazi do promjene plave boje u žutu. Intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri 450 nm te se na temelju

baždarnog dijagrama standarda kikirikija (Slika 8) određuje udio potencijalnih alergena kikirikija (mgkg^{-1}) u uzorcima.

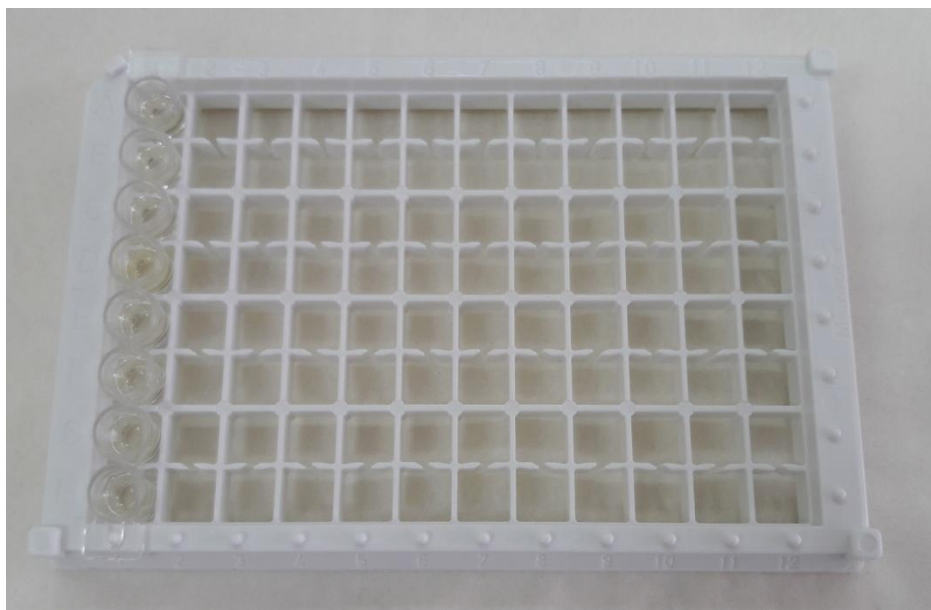
3.2.3.2. Postupak odrađivanja

Na držač je postavljen set od osam mikrojažica obloženih primarnim antitijelom, a ostale neiskorištene mikrojažice vraćene su u vrećicu s desikantom te čuvane za sljedeće mjerenje. Pomoću jednokanalne automatske pipete dodano je 100 μL dobivenog filtrata uzorka u svaku od osam jažica. Za svaki uzorak korišten je novi nastavak za pipetu te je sadržaj nastavka u potpunosti ispražnjen u jažicu. Držač s jažicama inkubiran je pri sobnoj temperaturi 20 minuta, nakon čega je sadržaj jažica okretanjem držača ispražnjen u otpadni spremnik. Nakon toga je proveden postupak ispiranja pri čemu je svaka jažica 5 puta isprana s razrijeđenim puferom za ispiranje. Između svakog koraka ispiranja mikrojažice su lupkane o sloj staničevine kako bi se uklonila zaostala voda.

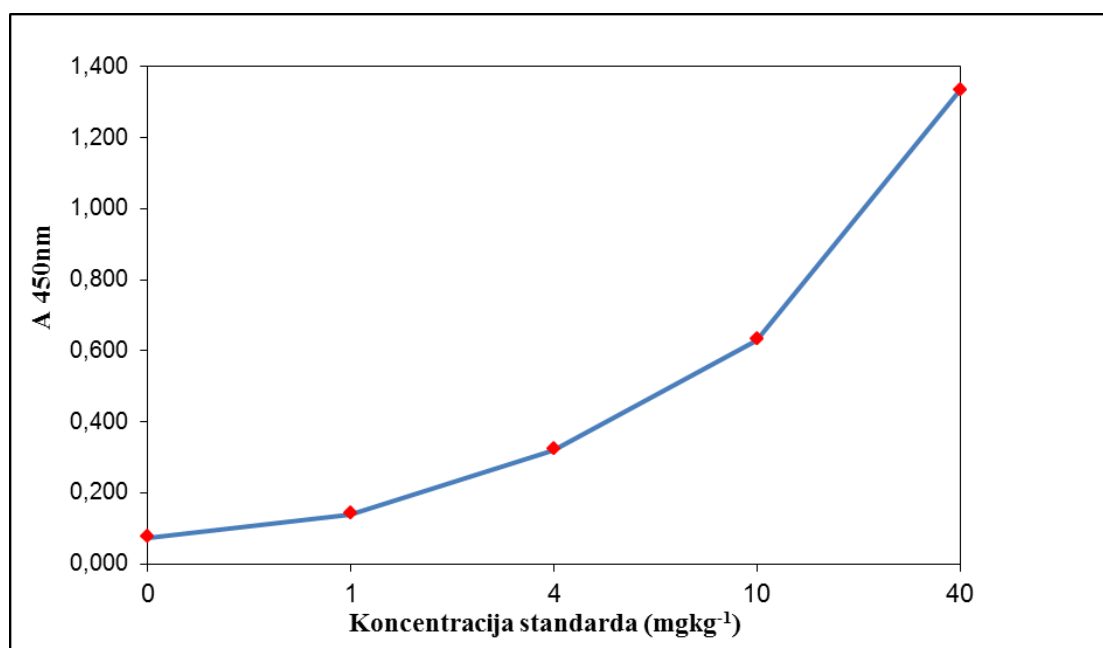
Nakon toga je u svaku jažicu dodano 100 μL reagensa koji sadrži sekundarna antitijela konjugirana s enzimima te je ponovno provedena inkubacija pri sobnoj temperaturi 20 minuta. Tijekom inkubacije važno je ne pomicati držač s jažicama kako ne bi došlo do kontaminacije iz jedne jažice u drugu. Sadržaj mikrojažica ispražnjen je u otpadni spremnik, a mikrojažice su isprane 5 puta s razrijeđenim puferom za ispiranje i prosušene lupkanjem o staničevinu. Zatim je u svaku mikrojažicu otpipetirano 100 μL reagensa koji sadrži supstrat za enzim te je provedena inkubacija pri sobnoj temperaturi 20 minuta u tami.

Nakon inkubacije u tami, u svaku mikrojažicu je dodano 100 μL „stop“ otopine nakon čega je došlo do promjene plave boje u žutu.

Držač s mikrojažicama pažljivo je prenesen do čitača s filterom od 450 nm te je pokrenut računalni program za očitavanje apsorbancije. Udio alergena kikirikija u svakom od analiziranih uzoraka određen je na osnovu prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda kikirikija (Slika 8), pri čemu su koncentracije otopina standarda iznosile 0, 1, 4, 10 i 40 mgkg^{-1} .



Slika 7. Držač s mikrojažicama



Slika 8. Baždarni dijagram standarda kikirikija

3.2.4. Upitnik o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije

Svrha upitnika bila je prikupiti stavove i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Upitnik je proveden na uzorku od 79 ispitanika (15 muškaraca i 64 žene) starijih od 18 godina na području grada Zagreba.

Upitnik se sastojao od tri grupe pitanja: prva grupa pitanja vezana je uz socio-demografske karakteristike ispitanika, a ostale dvije su usko vezane uz nutritivne alergije te kikiriki kao jedan od najčešćih alergena. Dva pitanja su otvorenog tipa dok su ostala zatvorenog tipa; pet s dihotomnim odgovorima (da-ne); osam 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 deskriptivna statistika (\bar{X} -srednja vrijednost i SD-standardna devijacija) i udio ispitanika (%).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja ELISA testom određen je udio potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima keksa i čajnih peciva. Također, ispitani su stavovi i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Rezultati određivanja udjela potencijalnih alergena kikirikija (mgkg^{-1}) prikazani su u Tablicama 2, 4 i 6. Stavovi i mišljenja potrošača, prikupljeni putem upitnika, prikazani su grafički na Slikama 9-15.

4.1. UDIO POTENCIJALNIH ALERGENA KIKIRIKIJA ODREĐENIH ELISA TESTOM U UZORCIMA KEKSA I ČAJNIH PECIVA

Tijekom ovog istraživanja proveden je ELISA test kojim je kvantitativno određena prisutnost alergena kikirikija u uzorcima keksa i čajnih peciva. Set za ELISA test AgraQuant Peanut Assay nabavljen je od proizvođača Romer Labs, Austrija. Limit detekcije ELISA testa iznosi $0,10 \text{ mgkg}^{-1}$. Udio alergena kikirikija izražen je u mgkg^{-1} .

Rezultati određivanja grupirani su prema mjestu nabavke uzoraka (trgovački lanci, pekarnice ili slastičarnice) te ukazuju na prisutnost alergena kikirikija u uzorcima analiziranim ELISA testom (Tablice 2, 4 i 6). Usporedno s rezultatima ELISA testa, tablično su prikazani navodi u okviru informacija o hrani pripadajućih analiziranih proizvoda (Tablice 3, 5 i 7), a koji su neposredno vezani uz eventualnu prisutnost alergena kikirikija.

Rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n=10$) keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca

UZORAK	Udio alergena kikirikija [mgkg^{-1}] (srednja vrijednost \pmSD)
KT ₁	1,40 \pm 0,004
KT ₂	0,34 \pm 0,002
KT ₃	0,32 \pm 0,002
KT ₄	0,33 \pm 0,002
KT ₅	0,14 \pm 0,001
KT ₆	0,29 \pm 0,002
KT ₇	0,18 \pm 0,001
KT ₈	0,27 \pm 0,002
KT ₉	0,27 \pm 0,002
KT ₁₀	0,17 \pm 0,002
Prosječna vrijednost	0,37
Raspon	0,14 – 1,40

Prisutnost alergena kikirikija detektirana je u svih deset analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca. Udio alergena kikirikija kretao se u rasponu od 0,14 mgkg^{-1} („KT₅“) do 1,40 mgkg^{-1} („KT₁“), pri čemu je prosječna vrijednost iznosila 0,37 mgkg^{-1} . Najveći udio kikirikija (1,40 mgkg^{-1}) određen je u uzorku „KT₁“ što je opravdano navodom o mogućoj prisutnosti kikirikija u proizvodu. Ostali proizvodi, izuzev uzorka „KT₆“ koji je također sadržavao navod o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija, nisu sadržavali navode o prisutnosti kikirikija iako je ovim istraživanjem potvrđena njihova prisutnost. U Tablici 3 prikazani su navodi o prisutnosti alergena u analiziranim uzorcima proizvoda 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 kikirikija

UZORAK	Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena kikirikija
KT ₁	Može sadržavati tragove sezama, kikirikija i orašastog voća
KT ₂	Može sadržavati tragove orašastog voća i mlijeka
KT ₃	Može sadržavati orašaste plodove u tragovima
KT ₄	Može sadržavati mlijeko i orašasto voće u tragovima
KT ₅	Sastojci: pšenično brašno... zobene pahuljice...
KT ₆	Može sadržavati kikiriki i orašasto voće u tragovima
KT ₇	Sastojci: pšenično brašno...laktoza (mlijeko)...
KT ₈	Može sadržavati tragove lješnjaka, badema i pistacija
KT ₉	Sastojci: pšenično brašno... sojin lecitin... obrano mlijeko u prahu...
KT ₁₀	Može sadržavati tragove jaja, orašastih plodova i mlijeka

Upotreba oznaka o predostrožnosti ne mora odražavati istiniti sadržaj alergena u hrani. Ford i suradnici (2010) proveli su istraživanje kojemu je cilj bio odrediti učestalost i razinu kontaminacije proizvoda sa savjetodavnim navodima koji sadrže tri najveća alergena (jaja, mlijeko i kikiriki), utvrditi da li stupanj rizika za navedene alergene varira između velikih i malih proizvođača te odrediti učestalost i razinu kontaminacije proizvoda bez savjetodavnih oznaka. Pretpakirani prehrambeni proizvodi prikupljeni su za analizu u različitim supermarketima u New Yorku i New Jerseyu. Istraživanje je uključivalo 8 kategorija proizvoda s ili bez savjetodavnog navoda o sadržaju alergena. Rezultati kontaminacije alergenima prema kategoriji proizvoda bili su: smjese za pečenje (5/80), čokolade (4/68), ne-čokoladne slastice koje sadrže kikiriki (2/11), keksi (6/85), slane grickalice (2/81), žitarice (0/59), tjestenine (0/15), smjese za palačinke (0/2). Prema veličini serviranja, kontaminacija alergenima jaja iznosila je 0,084 do 0,26 mg, kontaminacija alergenima mlijeka iznosila je 0,13 do 7,3 mg dok je kontaminacija alergenima kikirikija iznosila 0,17 do 5,8 mg po serviranju.

Istraživanje je pokazalo mjerljive razine ostataka alergena u 5,3 % proizvoda koji su sadržavali savjetodavne oznake te u 1,9 % sličnih proizvoda bez savjetodavnih oznaka. Usporedbom proizvoda malih i velikih proizvođača, kod malih proizvođača je otkrivena razina kontaminacije u 5,1 % proizvoda u odnosu na velike proizvođače kod kojih je zabilježena kontaminacija u 0,75 % proizvoda. U ovome je istraživanju utvrđeno 4,5 %

proizvoda sa savjetodavnim navodom koji su imali mjerljive razine kikirikija, a prema procjeni rizika na temelju veličine serviranja, samo bi jedan od pet proizvoda prelazio graničnu vrijednost.

Ovo istraživanje ukazuje da bi alergični potrošači trebali izbjegavati proizvode sa savjetodavnim oznakama, koji predstavljaju mali ali potencijalni rizik, te da budu oprezni prema proizvodima koji ne sadrže savjetodavne oznake, a posebno prema onima od malih proizvođača te onima koji pripadaju u kategoriju proizvoda s povećanim rizikom. Rezultati ukazuju na rizik kojemu su izloženi alergični potrošači te ukazuje na potrebu povećanja svijesti kod proizvođača (Ford i sur., 2010).

U Tablici 4 prikazani su rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima keksa i čajnih peciva prikupljenih u različitim pekarnicama. Udio potencijalnih alergena kikirikija kretao se u rasponu od 0,12 mgkg⁻¹ („KP₇“) do 1,07 mgkg⁻¹ („KP₈“), pri čemu je prosječna vrijednost iznosila 0,38 mgkg⁻¹.

Tablica 4. Udio (mgkg⁻¹) alergena kikirikija u uzorcima (n=10) keksa i čajnih peciva iz pekarnica

UZORAK	Udio alergena kikirikija [mgkg⁻¹] (srednja vrijednost ±SD)
KP ₁	0,22 ± 0,001
KP ₂	0,38 ± 0,001
KP ₃	0,34 ± 0,002
KP ₄	0,63 ± 0,002
KP ₅	< LOD [*]
KP ₆	0,15 ± 0,002
KP ₇	0,12 ± 0,001
KP ₈	1,07 ± 0,002
KP ₉	0,13 ± 0,001
KP ₁₀	0,40 ± 0,002
Prosječna vrijednost	0,38
Raspon	0,12 – 1,07

*limit detekcije (engl. *Limit Of Detection*)

Najveći udio alergena kikirikija ($1,07 \text{ mgkg}^{-1}$) određen je u uzorku „KP₈“. U uzorku „KP₅“ nije potvrđena prisutnost alergena kikirikija, odnosno dobiveni udio je ispod limita detekcije (LOD) koji za korištenu ELISA metodu u ovom radu iznosi $0,10 \text{ mgkg}^{-1}$. U preostalih devet uzoraka je ovim istraživanjem određena prisutnost alergena kikirikija iako analizirani proizvodi nisu sadržavali navod o mogućoj prisutnosti kikirikija. U sklopu informacije o hrani na popisu sastojaka (Tablica 5) su navedene druge tvari koje mogu izazvati alergije ili netolerancije poput: pšeničnog brašna, jaja, margarina, mlijeka, orašastog voća što je sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani (Uredba, 2011).

Tablica 5. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz pekarnica vezani uz prisutnost alergena kikirikija

UZORAK	Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena kikirikija
KP ₁	Sastav: brašno...jaja...
KP ₂	Može sadržavati tragove lješnjaka, oraha, badema i pistacije
KP ₃	Sastav: brašno...bademi, orasi...
KP ₄	Može sadržavati mlijeko i drugo orašasto voće
KP ₅	Sastav: brašno...bademi, orasi...
KP ₆	Može sadržavati mlijeko i drugo orašasto voće
KP ₇	Sastojci: brašno...jaja, mlijeko...orasi...
KP ₈	Mogući su tragovi lješnjaka, badema i pistacije
KP ₉	Može sadržavati tragove lješnjaka, oraha, badema i pistacije
KP ₁₀	Bez navoda

Remington i suradnici (2013) proveli su istraživanje na području Nebraske u SAD-u kako bi utvrdili razine ostataka kikirikija u različitim pakiranjima prehrambenih proizvoda sa savjetodavnim označavanjem uspoređujući pritom slične podatke iz 2005. i 2009. godine te su nastojali utvrditi potencijalni rizik za potrošače s alergijom na kikiriki. Za analizu su uzeta ukupno 202 pretpakirana prehrambena proizvoda, od kojih je 186 sadržavalo savjetodavne navode koji se odnose na kikiriki te 16 proizvoda koji su sadržavali kikiriki naveden kao sporedni sastojak. Proizvodi su bili kategorizirani kao pekarski proizvodi/mješavine, sastojci za pečenje, slatkiši/konditorski proizvodi, žitarice/pločice od žitarica, smrznuti deserti, instant hrana, nutritivne pločice i grickalice. Prikupljene su po dvije različite serije svakog proizvoda pa je ukupan broj uzoraka iznosio 404. Uzorkovanje je dizajnirano u nastojanju da se ponovi

istraživanje provedeno 2005. godine od strane Hefle i suradnika (2007). Otkrivene su razine kikirikija u nutritivnim pločicama sa savjetodavnim označavanjem (6/24), slatkišima/konditorskim proizvodima (4/32), sastojcima za pečenje (2/16), žitaricama/pločicama od žitarica (2/20), grickalicama (1/25) i u pekarskim proizvodima/mješavinama (1/43). Mjerljive razine kikirikija nisu pronađene u smrznutim desertima sa savjetodavnim označavanjem (0/9) niti u instant proizvodima (0/17). Dobiveni rezultati istraživanja slični su onima provedenim od strane Hefle i sur. (2007) gdje su pronađene razine kikirikija u 7,3 % proizvoda iz iste kategorije sa savjetodavnim označavanjem. Također, provedeno istraživanje nutritivnih pločica sa savjetodavnim označavanjem koje se odnosi na kikiriki, a koje su uzete u analizu u istraživanjima iz 2005. i 2009. godine. Od 399 različitih nutritivnih pločica, 169 je sadržavalo kikiriki u popisu sastojaka, 166 je sadržavalo savjetodavni navod o mogućoj prisutnosti kikirikija, 15 je bilo s navodom koji upućuje na neprisutnost kikirikija te 49 bez naznake o prisutnosti kikirikija na deklaraciji. Od nutritivnih pločica gdje je kikiriki naveden kao sporedni sastojak, 34 od 44 je bilo pozitivno na kikiriki. Ovi proizvodi su zajedno sadržavali do oko 44000 mgkg⁻¹ kikirikija pri čemu je 9 pločica sadržavalo preko 1100 mgkg⁻¹, 9 pločica 50-650 mgkg⁻¹ te 16 pločica 3,5-11 mgkg⁻¹. 5 nutritivnih pločica imalo je naveden kikiriki kao sporedni sastojak te su sadržavale navod koji je upućivao da su proizvedeni u istom proizvodnom objektu gdje se također koristi kikiriki. Rezultati su bili pozitivni na kikiriki te su se kretali u rasponu od 17-49000 mgkg⁻¹. Od 159 nutritivnih pločica sa savjetodavnim navodom koji upućuje na prisutnost kikirikija, 12 je sadržavalo kikiriki pri čemu je jedan uzorak sadržavao 26000 mgkg⁻¹, 4 uzorka 70-150 mgkg⁻¹ i 7 uzoraka 3-40 mgkg⁻¹. 7 prehrambenih pločica je sadržavalo navod „Može sadržavati orašaste plodove“, a dva od sedam uzoraka je bilo pozitivno na kikiriki sa vrijednostima od 2,8 i 16,2 mgkg⁻¹. U 15 proizvoda s različitim navodima koji upućuju na neprisutnost kikirikija, poput „Proizvedeno u objektu bez kikirikija“, „Proizvedeno u objektu bez orašastih plodova i kikirikija“ ili „Bez prisutnosti orašastih plodova“, nije zabilježena prisutnost kikirikija. Dvije od 49 nutritivnih pločica bez naznake o prisutnosti kikirikija na deklaraciji bile su pozitivne na kikiriki sa izmjerenim vrijednostima 13 i 1260 mgkg⁻¹. Probabilistička procjena rizika pokazala je da je rizik od alergijske reakcije kod potrošača alergičnih na kikiriki na temelju savjetodavnih oznaka na prehrambenim pločicama bio značajan, ali ovisno o robnoj marki. Savjetodavno označavanje o sadržaju kikirikija može biti prekomjerno korišteno kod nekih nutritivnih pločica, dok kod drugih može biti korišteno s više opreza. Probabilistički pristup bi prehrambenoj industriji

mogao omogućiti kvantitativnu metodu koja bi pomogla kod određivanja kada bi savjetodavno označavanje bilo najprikladnije (Remington i sur., 2013).

Rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima keksa i čajnih peciva iz različitih slastičarnica prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n=8$) keksa i čajnih peciva iz slastičarnica

UZORAK	Udio alergena kikirikija [mgkg^{-1}] (srednja vrijednost \pmSD)
KS ₁	0,20 \pm 0,001
KS ₂	0,33 \pm 0,003
KS ₃	0,28 \pm 0,003
KS ₄	0,11 \pm 0,001
KS ₅	0,30 \pm 0,001
KS ₆	0,16 \pm 0,002
KS ₇	0,69 \pm 0,002
KS ₈	0,18 \pm 0,001
Prosječna vrijednost	0,28
Raspon	0,11 – 0,69

Udio alergena kikirikija u osam analiziranih uzoraka kretao se u rasponu od 0,11 mgkg^{-1} („KS₄“) do 0,69 mgkg^{-1} („KS₇“), pri čemu je prosječna vrijednost iznosila je 0,28 mgkg^{-1} . U svih 8 uzoraka ELISA metodom je određena prisutnost alergena kikirikija iako on nije bio naveden na informaciji o hrani.

Slastičarnice kao subjekti u poslovanju s hranom imaju u ponudi nepretpakiranu hranu te su prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 dužni informirati potrošače o potencijalnoj prisutnosti alergena u hrani bilo pisanim ili usmenim putem (Uredba, 2011). Informacija o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija u uzorcima iz slastičarnica („KS₁“ – „KS₈“), koji su analizirani tijekom ovog istraživanja, dobivena je usmenim putem te je za svih 8 uzoraka odgovor bio da ne postoji mogućnost prisutnosti alergena kikirikija u tragovima. Kako rezultati dobiveni ELISA testom ukazuju na prisutnost alergena, potreban je dodatni oprez kod davanja informacija o hrani potrošačima.

U Republici Hrvatskoj je od 13. prosinca 2014. godine na snazi Pravilnik o informiranju potrošača o nepretpakiranoj hrani (Pravilnik, 2014) kojim se propisuju opća načela, zahtjevi i odgovornosti subjekata u poslovanju s hranom (SPH) u vezi s informacijama o nepretpakiranoj hrani, uključujući informacije o prisutnosti tvari ili proizvoda koji mogu izazvati alergije ili netolerancije. Svi sastojci ili pomoćne tvari upotrijebljene u procesu proizvodnje ili pripreme hrane koji su prisutni u gotovom proizvodu, a koji uzrokuju alergije ili netolerancije, trebaju biti navedeni u popisu sastojaka u okviru informacija o hrani.

Informacije o alergenima mogu se pružiti i usmenim putem pri čemu SPH treba voditi računa o tome da se na vidljivom mjestu nalazi obavijest koja upućuje na mjesto na kojem su informacije dostupne ili postoji obavijest kojom se potrošači pozivaju da se za informacije o prisutnosti tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili netolerancije obrate osoblju. Navedena obavijest mora biti lako uočljiva, jasno čitljiva, i gdje je primjenjivo, neizbrisiva. Također, informacije moraju biti dostupne u ispisanom ili elektroničkom obliku u objektu u kojem se hrana prodaje kako bi na zahtjev bile lako dostupne potrošaču i nadležnim inspekcijama te moraju biti dostupne prije nego što je hrana ponuđena na prodaju (Pravilnik, 2014).

Tablica 7. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz slastičarnica vezani uz prisutnost alergena kikirikija

UZORAK	Navod na deklaraciji vezan uz prisutnost alergena kikirikija
KS ₁	Sastojci: ...protein lupine ... bademi ... sladilo: steviol glikozid, eritritol ...
KS ₂	Sastojci: maslac, brašno, jaje...
KS ₃	Bez navoda
KS ₄	Alergeni: mlijeko, jaja, orašasti plodovi, soja u tragovima
KS ₅	Sastojci:...protein lupine ... bademi ... sladilo: steviol glikozid, eritritol ...
KS ₆	Bez navoda
KS ₇	Može sadržavati tragove jaja i orašastih plodova
KS ₈	Bez navoda

U istraživanju Robertson i suradnika (2013) analizirano je 38 pretpakiranih prehrambenih proizvoda prikupljenih s različitih lokacija u Irskoj koji su analizirani u Lincolnu, SAD. Proizvodi su kategorizirani kao pekarski proizvodi, keksi, pločice od žitarica, čokolade i nutritivne pločice. Od 38 proizvoda, 30 je sadržavalo različite savjetodavne navode dok je 8 sadržavalo kikiriki ili orašaste plodove koji su bili navedeni kao sporedni sastojci. U ovom

istraživanju 21 od 38 (55 %) proizvoda sadržavalo je navod o prisutnosti alergena u obliku „Može sadržavati“ te je to ujedno i najčešće korišteni oblik navoda. Primjenom ELISA metode niti u jednom od 13 proizvoda sa savjetodavnim navodom o prisutnosti orašastih plodova nisu otkriveni tragovi kikirikija. Kikiriki je detektiran u 2 od 38 (5,3 %) proizvoda od svih analiziranih proizvoda, uključujući 2 od 25 (8 %) sa savjetodavnim navodom koji se odnosi na kikiriki. U jednoj od 3 različite serije čokoladnih pločica otkrivena je razina kikirikija od 25,8 mgkg⁻¹, a doza po predloženoj veličini serviranja iznosila je 0,52 mg kikirikija. Izjava o prisutnosti alergena na pakiranju ovoga proizvoda bila je navedena u obliku „Može sadržavati tragove kikirikija“. U četiri različite serije pločica od žitarica otkrivene su razine kikirikija u rasponu od 2,8 do 7,4 mgkg⁻¹, a doza po predloženoj veličini serviranja kretala se u rasponu od 0,14 do 0,33 mg kikirikija. Kod ovih pločica nalazio se navod u obliku „Proizvedeno u istom objektu“ što je potrošačima ukazivalo na potencijalnu prisutnost kikirikija u navedenim proizvodima. Samo je jedan proizvod sadržavao navod „Proizvedeno na zajedničkoj opremi“ ukazujući na to da se ovakav oblik savjetodavnog navoda koristi rjeđe u Irskoj u odnosu na SAD. Također su istraživani proizvodi kod kojih su bili navedeni kikiriki/orašasti plodovi kao sporedni sastojci, no niti jedan nije sadržavao mjerljive razine kikirikija. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su otkrivene razine kikirikija kod proizvoda koji sadrže savjetodavne navode o prisutnosti kikirikija u Irskoj niže nego u ostalim zemljama EU.

Kvantitativna procjena rizika ukazuje da bi vrlo mali postotak populacije alergične na kikiriki vjerojatno imao alergijsku reakciju na te proizvode, dok bi većina proizvoda sa savjetodavnim oznakama bila sigurna za alergičnu populaciju (Robertson i sur., 2013).

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

Tijekom ovog istraživanja ispitani su stavovi i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Ispitivanje je provedeno putem posebno osmišljenog upitnika (Prilog 1). Anketirano je 79 ispitanika. Odgovori na pitanja iz upitnika prikazani su tablično i grafički.

U Tablici 8 prikazane su demografske karakteristike ispitanika (n=79). Od ukupno 79 ispitanika, žena je bilo 81 %, a muškaraca 19 %. Većina ispitanika (49,4 %) je bila u dobi od 40 do 60 godina, a s obzirom na životno okruženje samo je manji dio ispitanika (10,1 %)

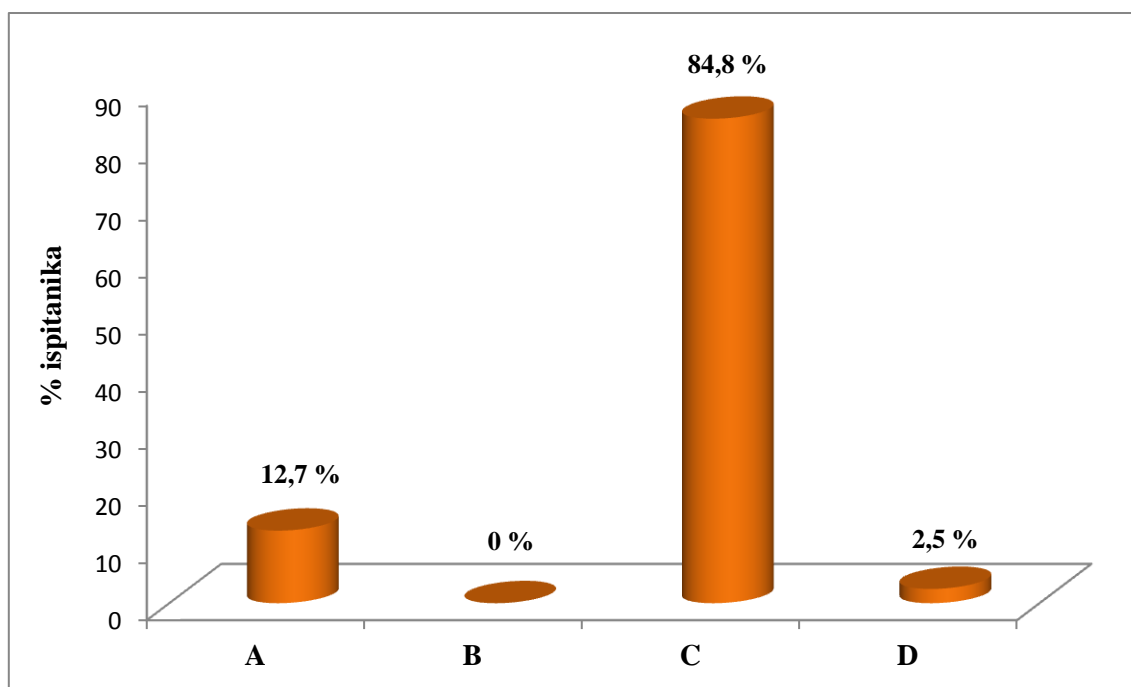
naveo kako živi na selu. Što se tiče obrazovanja, 34,2 % ispitanika je završilo srednju školu, 5,1 % ispitanika je imalo završenu osnovnu školu dok je ostali udio ispitanika sa sveučilišnim statusom.

Tablica 8. Demografske karakteristike ispitanika (n=79)

Demografski podaci		n	%
Spol	Žene	64	81
	Muškarci	15	19
Dob	Studentska populacija (18-30 god)	28	35,4
	Rana odrasla dob (30-40 god)	8	10,1
	Srednja dob (40-60 god)	39	49,4
	Kasna odrasla dob (>60 god)	4	5,1
Obrazovanje	Osnovna škola	4	5,1
	Srednja škola	27	34,2
	Sveučilišna razina (fakultet)	48	60,7
Životno okruženje	Selo	8	10,1
	Grad	71	89,9
Ukupno		79	100

Na Slici 9 prikazani su odgovori ispitanika na pitanje „Što je alergija?“. Vidljivo je kako je većina (84,8 %) upoznata s tim pojmom, no ipak 12,7 % smatra kako su alergija i netolerancija isti pojmovi. Važno je pritom 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 netoleranciju na određeni sastojak hrane (primjerice laktozu) koja nije posredovana imunološkim sustavom.

Od ispitanika koji su se izjasnili da imaju nutritivnu alergiju (7), naveli su da imaju alergiju na natrijev benzoat i tartrazin, cimet, svježe voće, lješnjake, pistacije, proteine mlijeka i laktozu. Ostalih 72 ispitanika nema nutritivnu alergiju.



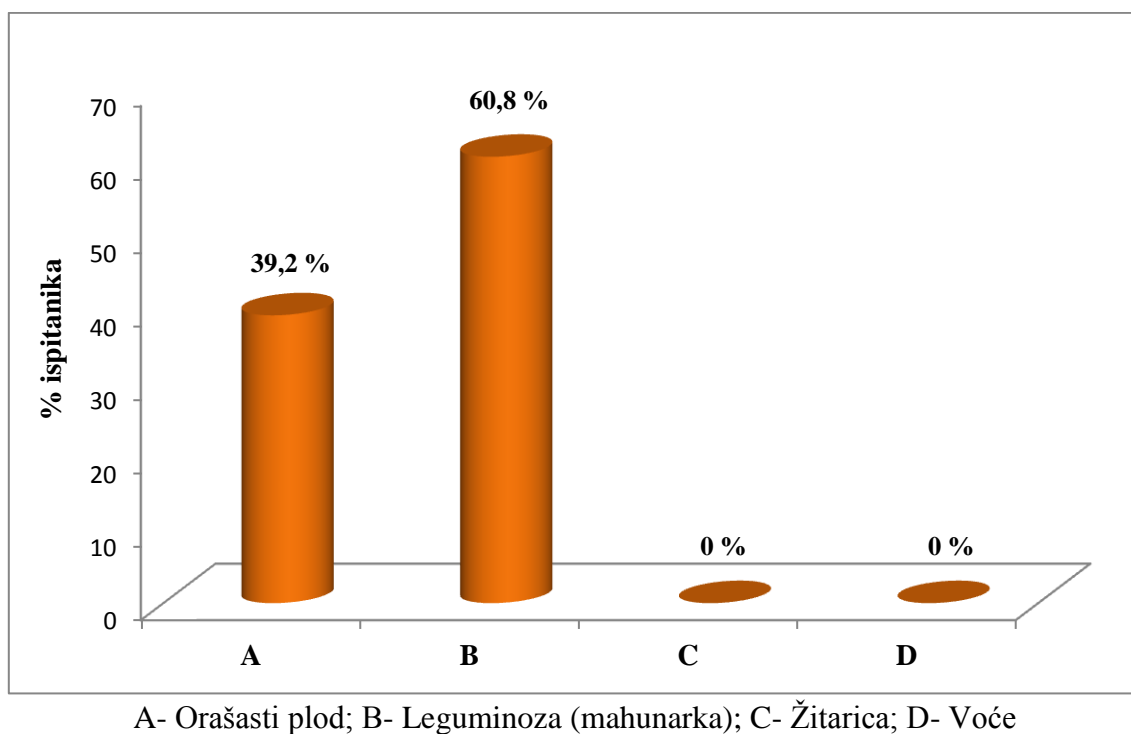
A- netolerancija (nepodnošenje) specifične tvari; B- bolest izazvana virusnom ili bakterijskom infekcijom; C- prekomjerna reakcija obrambenog sustava organizma u ponovljenom doticaju s alergenom; D- neimunološki posredovana reakcija organizma

Slika 9. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=79) na pitanje „Što je alergija?“

U istraživanju Allan (2016) provedenom u Australiji nastojala su se ispitati znanja o nutritivnoj alergiji te stavovi i uvjerenja roditelja djece s i bez alergije na hranu. Također, nastojala se provesti međukulturna usporedba između roditelja iz Australije, SAD-a i Nizozemske. Rezultati istraživanja su pokazali da nije bilo značajne razlike u razini znanja roditelja djece starosti do 18 godina koji imaju nutritivnu alergiju u usporedbi s roditeljima djece koja nemaju nutritivnu alergiju. Većina sudionika bila je upoznata s ulogom imunološkog sustava i implikacijama alergijskih reakcija na hranu. Također, većina sudionika je pokazala znanje o nastanku alergijskih reakcija te o najčešćim alergenima. Iznenadujuće, roditelji alergične djece su imali manje znanja o tome da su morski plodovi/školjkaši najčešći izvor alergena kod odraslih osoba u Australiji. Nadalje, obje su grupe roditelja imale ograničeno znanje o tome da su adolescenti podložniji riziku od smrtonosnih alergijskih reakcija na hranu u odnosu na djecu. Samo je polovica roditelja djece koja nisu alergična prepoznala da ne postoji lijek za nutritivnu alergiju te da dnevni antihistaminski lijek ne sprječava alergijsku reakciju na hranu. Obje grupe roditelja smatraju da je najvažniji korak za poboljšanje života osoba s alergijom na hranu utvrditi uzrok alergijske reakcije te pronaći

odgovarajući lijek. Uz to, potrebna je edukacija kako bi se osigurala sigurnost djece s nutritivnom alergijom (Allan, 2016).

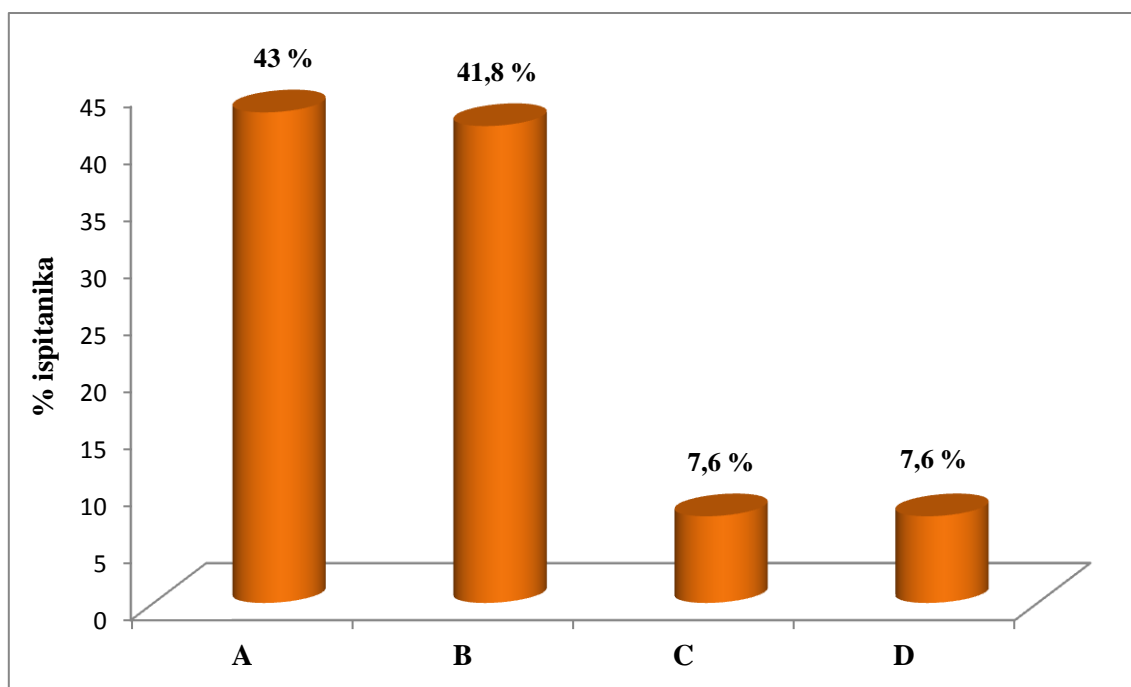
Na Slici 10 prikazani su odgovori ispitanika na pitanje u koju skupinu namirnica se ubraja kikiriki. Više od polovice ispitanika (60,8 %) je navelo ispravno da kikiriki pripada u skupinu leguminoza (mahunarki), no ipak je veliki broj ispitanika (39,2 %) svrstao kikiriki u skupinu orašastih plodova. Niti jedan ispitanik nije svrstao kikiriki u skupinu „Žitarice“ ili „Voće“.



Slika 10. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=79) na pitanje „Što je kikiriki?“

Prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 kikiriki je naveden u zasebnoj skupini alergena „Kikiriki i proizvodi od kikirikija“, pri čemu navod koji se odnosi na moguću prisutnost orašastih plodova ne uključuje i kikiriki (Uredba, 2011). Prema tome bi proizvođači jednako tako kao i potrošači trebali biti upoznati s tom činjenicom kako ovakvi navodi ne bi potrošače doveli na krivi zaključak.

Na Slici 11 prikazani su odgovori ispitanika o navikama vezanim uz način konzumacije kikirikija. Najveći dio ispitanika (84,8 %) naveo je kako najčešće konzumira ili svježi kikiriki iz ljuske ili prženi iz konzerve. Manji dio ispitanika (7,6 %) je naveo da ga konzumira u sklopu obroka, a isto toliko ispitanika uopće ne konzumira kikiriki.

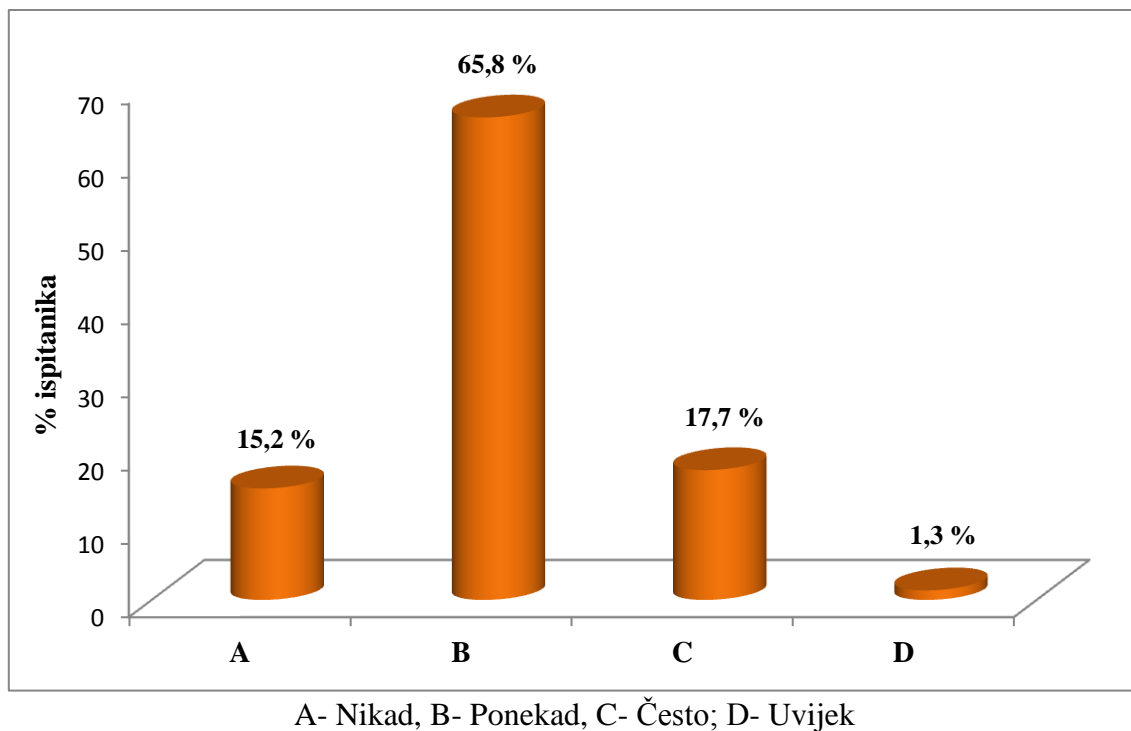


A- Svježi iz ljuske; B- Prženi iz konzerve; C- Kao komponenta obroka (grickalice, kikiriki maslac, umaci); D- Ne konzumiram kikiriki

Slika 11. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=79) na pitanje „U kojem obliku najčešće konzumirate kikiriki?“

U istraživanju Garcia i suradnika (1990) o konzumaciji kikirikija na Filipinima ustanovljeno je kako se kikiriki najčešće konzumira pržen (62,5 %), kuhan (60,1 %) ili u obliku maslaca od kikirikija (61,6 %). Ulje od kikirikija bilo je relativno nepoznato za potrošače Filipina, dok je prema preferencijama potrošača maslac od kikirikija bio najomiljeniji proizvod (35,4 %), nakon čega je slijedio prženi (17,2 %), pečeni (16,6 %) te naposljetku kuhani kikiriki (11,1 %). Prema stavovima potrošača, kikiriki je hranjiv (74,7 %), ukusan (57,2 %), zdrav (29,2 %) no skup (25,3 %) prehrambeni proizvod (Garcia i sur.,1990).

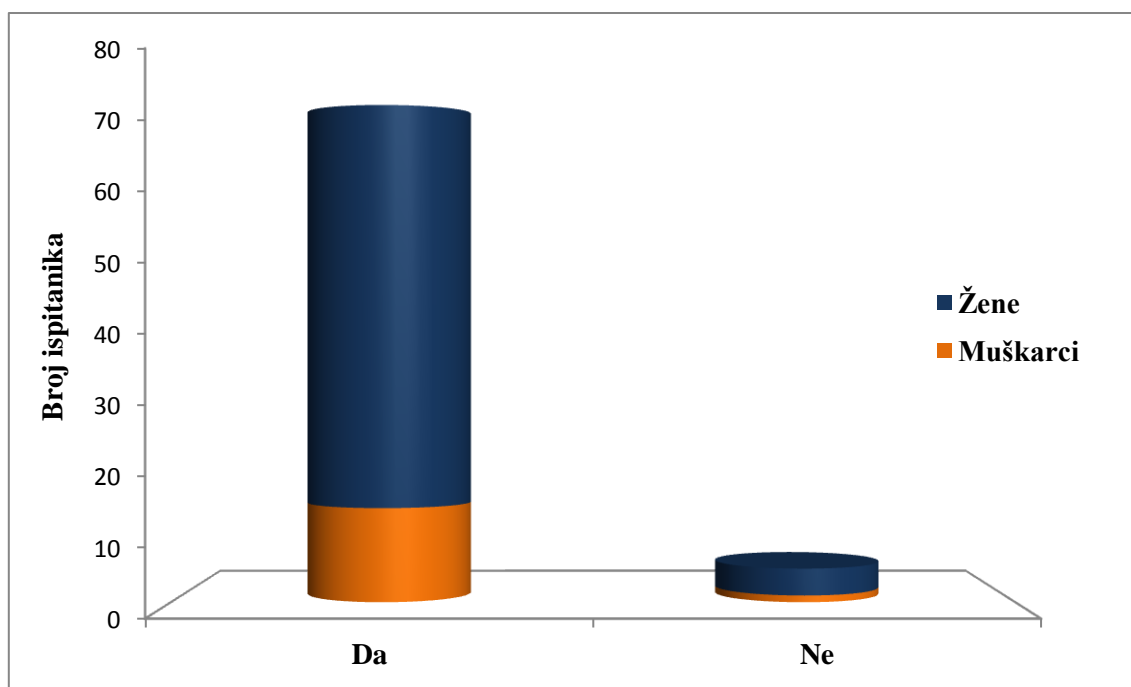
Na pitanje vezano uz učestalost kupovanja keksa i čajnih peciva na različitim prodajnim mjestima, najviše ispitanika (65,8 %) odgovorilo je kako ponekad kupuje kekse i čajna peciva s različitih prodajnih mjesta, 17,7 % ih često kupuje dok ih 15,2 % nikada ne kupuje (Slika 12).



Slika 12. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=79) na pitanje „Kupujete li kekse ili čajna peciva na prodajnim mjestima poput slastičarnice, pekarnice ili trgovačkog lanca?“

U istraživanju Lee i Xu (2015) provedeno je ispitivanje menadžerskog osoblja (n=110) u restoranima SAD-a kako bi se istražile njihove razine znanja o nutritivnoj alergiji, osviještenost te spremnost na posluživanje klijenata s nutritivnom alergijom. Srednja vrijednost znanja o nutritivnoj alergiji iznosila je $19,7 \pm 4,6$ od maksimalno 28. Većina sudionika bi prilagodila recepte za klijente s alergijama (n=85), no kupci s nutritivnom alergijom bi trebali biti odgovorni za traženje specijalnih obroka. 76 ispitanika je osiguralo zaposlenicima izobrazbu o nutritivnoj alergiji. Ispitanici su utvrdili da su prepreke kod provođenja obuke nedovoljna posvećenost zaposlenika te vremenska ograničenja. Iz ovog istraživanja možemo zaključiti kako bi restorani trebali uspostaviti sigurno mjesto za pružanje obroka kroz dobro planirane politike o nutritivnoj alergiji te redovitu obuku zaposlenika o alergiji na hranu (Lee i Xu, 2015).

Odgovori ispitanika koji se odnose na prisutnost tragova kikirikija u keksima i čajnim pecivima prikazani su na Slici 13. Od 79 ispitanika, 74 ih smatra kako takvi proizvodi mogu sadržavati tragove kikirikija, dok ostalih 5 ne smatra tako.



Slika 13. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=79), obzirom na spol, na pitanje „Smatrate li da keksi ili čajna peciva mogu sadržavati tragove kikirikija?“

Predostrožno označavanje alergena navedeno na deklaraciji u obliku „Može sadržavati“ primjenjuje se na mnogim pretpakiranim prehrambenim proizvodima diljem svijeta. Ovaj oblik označavanje je dobrovoljan, a namjera mu je bila osigurati da pretpakirana hrana bude što sigurnija za alergične potrošače upozoravajući ih na moguću prisutnost ostataka alergena kao posljedice korištenja zajedničke procesne opreme, dijelova postrojenja ili drugih industrijskih praksi (Allen i Taylor, 2018).

Međutim, porast upotrebe ovakvih kao i raznih drugih navoda o predostrožnosti djeluje zbunjujuće na potrošače te utječe na smanjenje njihove kvalitete života. Pa tako potrošači ponekad smatraju da su predostrožni navodi temeljeni na količini prisutnih alergena u hrani, dok drugi smatraju da bi zaostale količine ostataka alergena u hrani uvijek trebale biti niske. Također, neki potrošači smatraju da bi količine ostataka alergena trebale biti nepromjenjive u proizvodima koji nose oznake o predostrožnosti, no u mnogim slučajevima su razine ostataka alergena prilično varijabilne. Stoga mnogi alergični potrošači ignoriraju ovakve predostrožne navode. Analitička istraživanja pokazuju da mnogi proizvodi s predostrožnim navodima ne sadrže mjerljive ostatke alergena te su potencijalno sigurni za alergične potrošače (Allen i Taylor, 2018).

Iako je nekoliko istraživanja pokazalo da bi alergični potrošači ignorirali predostrožne navode o prisutnosti alergena pod različitim okolnostima, provedeno je nekoliko studija za procjenu rizika koje se odnose na konzumaciju proizvoda s predostrožnim navodima o mogućoj prisutnosti alergena od strane alergičnih potrošača.

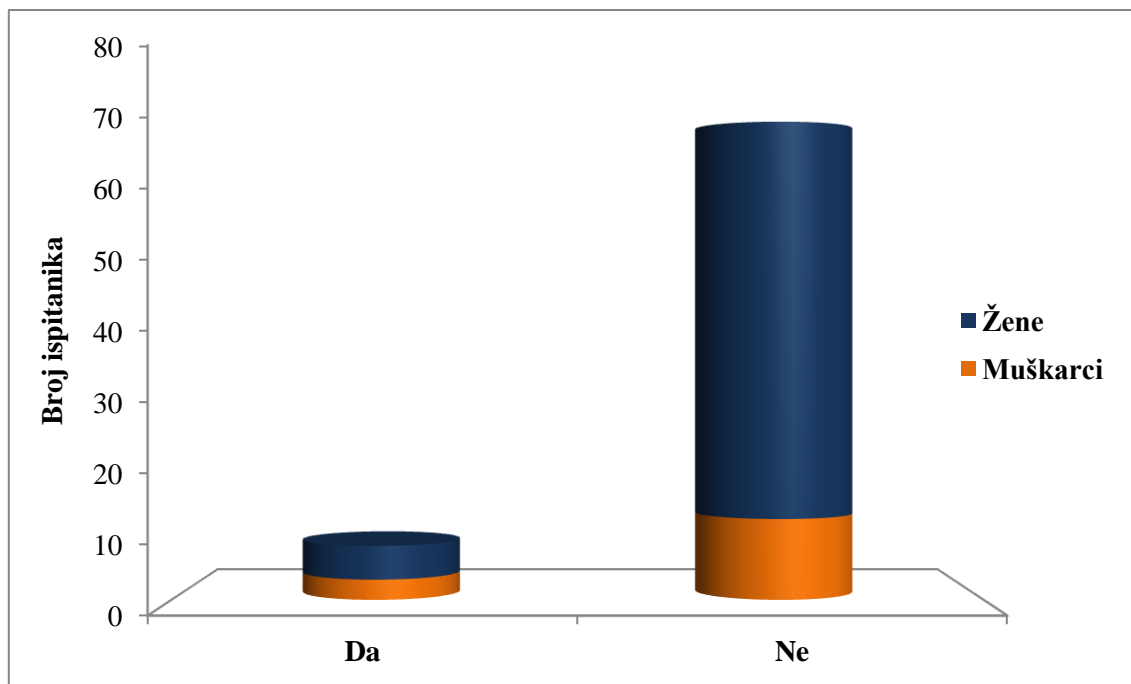
U istraživanju provedenom u Kanadi, u kojem je sudjelovalo 1454 alergičnih pojedinaca, 651 ispitanik je naveo kako je imao jednu ili više alergijskih reakcija na pretpakirane prehrambene proizvode pri čemu je 8,3 % ispitanika naveo kako je imalo alergijsku reakciju kao posljedicu unosa hrane koja je sadržavala predostrožnu oznaku o mogućoj prisutnosti alergena (Sheth i sur., 2010).

U manjem istraživanju provedenom u Škotskoj, u kojem je sudjelovalo 26 alergičnih adolescenata, koji su izjavili da su ignorirali predostrožne oznake o mogućoj prisutnosti alergena, samo je jedan adolescent naveo da je imao alergijsku reakciju (Gallagher i sur., 2012).

Međutim, u Poljskoj je zabilježen smrtni slučaj djeteta koje je bilo alergično na kikiriki nakon konzumacije čokolade s predostrožnim navodom o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija (Willak-Janc i Sikorska-Szaflik, 2016).

Iako bi daljnja analitička istraživanja hrane s i bez predostrožnih navoda o mogućoj prisutnosti alergena te dodatna istraživanja rizika povezana s ignoriranjem navoda o predostrožnosti mogla pomoći u razjašnjavanju trenutačne situacije, neophodna su globalna istraživanja u cilju definiranja graničnih vrijednosti za alergene zajedno s validacijom metoda za otkrivanje alergena za osiguravanje pristupa predostrožnim navodima temeljenim na riziku koji bi mogli razumjeti i koristiti stručnjaci pri savjetovanju svojih pacijenata. Stoga je potreban bolji pristup označavanju alergijskih sastojaka koji uravnotežuje zdravlje i sigurnost alergičnih potrošača s njihovom željom da uživaju u najširem mogućem izboru hrane dostupne na tržištu (Allen i Taylor, 2018).

Na pitanje da li bi kupili kekse ili čajna peciva koji sadrže kikiriki koji nije deklariran za nekoga tko ima alergiju na kikiriki (Slika 14) većina muškaraca (80 %) i žena (92,2 %) je odgovorilo kako takve proizvode ne bi kupili.



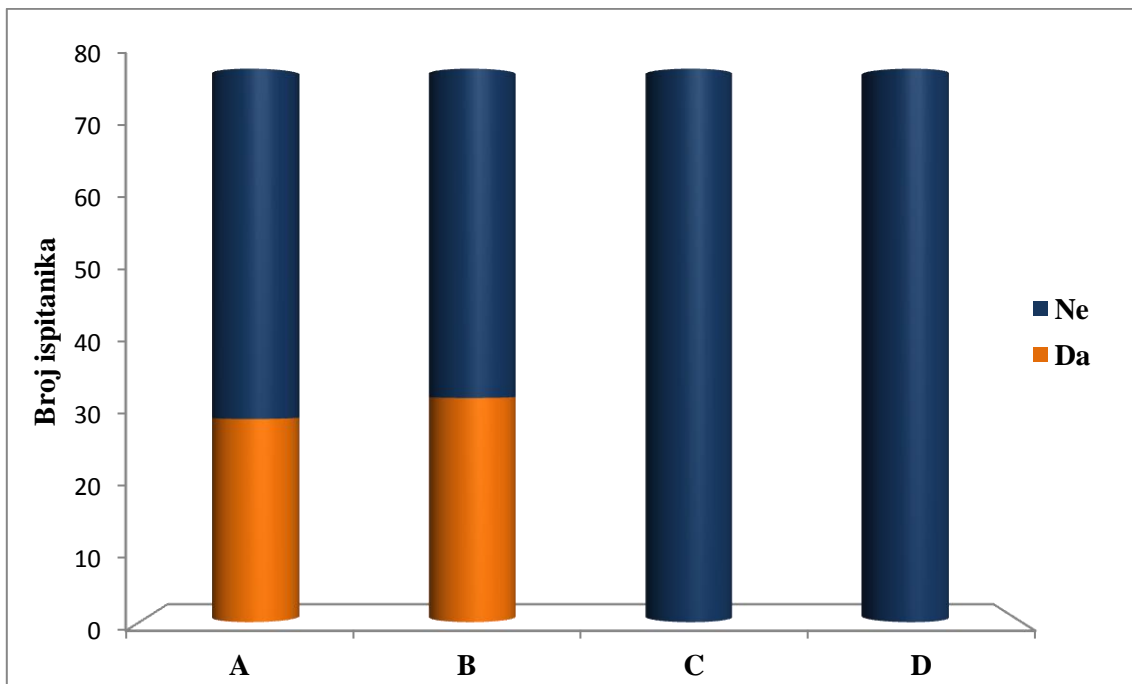
Slika 14. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=79), obzirom na spol, na pitanje „Ako imate ili poznajete nekoga tko ima alergiju na kikiriki, da li bi kupili kekse ili čajna peciva koja sadrže kikiriki koji nije deklariran?“

Unatoč poboljšanom označavanju alergena te pažljivim strategijama izbjegavanja, skriveni alergeni u hrani predstavljaju značajan rizik za neželjene reakcije kod potrošača s alergijama na hranu. Podaci iz istraživanja provedenog u Njemačkoj (Schnadt i Pfaff, 2016) pokazuju blagi pad broja potrošača koji izvješćuju o alergijskim reakcijama na pretpakiranu hranu. Ipak, 75 % je doživjelo barem jednu alergijsku reakciju nakon konzumacije pretpakirane hrane. Kod više od polovice slučajeva reakcije su klasificirane kao teške sa simptomima koji uključuju dišni i/ili kardiovaskularni sustav poput respiratornog poremećaja, sniženja krvnog tlaka ili anafilaktičkog šoka. Više od 40 % ispitanika je izvijestilo da na deklaraciji nije bila navedena informacija o prisutnosti alergena, bilo u popisu sastojaka ili kao predostrožna oznaka. Uzete su u obzir različite mogućnosti zbog kojih alergeni u hrani nisu prepoznati od strane potrošača s alergijama na hranu, a neki od navedenih razloga su nerazumljivo označavanje alergena, neočekivana prisutnost alergena kao i promjene recepata kod poznate hrane (Schnadt i Pfaff, 2016).

Surojanametakul i suradnici (2012) proveli su istraživanje o prisutnosti nedeklariranih alergena mlijeka, jaja, pšenice i kikirikija u komercijalnim prehrambenim proizvodima na Tajlandu. Primjenom kvantitativne ELISA metode, od ukupno 142 proizvoda, 55 je sadržavalo nedeklarirane alergene s udjelom $\geq 10 \text{ mgkg}^{-1}$. Od pozitivnih 55 slučajeva, među

najčešćim proizvodima bili su oni koji su sadržavali alergene mlijeka (21 proizvod), zatim proizvodi s alergenima pšenice i jaja s podjednakom učestalošću (17 proizvoda) dok je kikiriki bio rijetko zastupljen. Ovi rezultati pokazuju da je potrebno povećati osviještenost tajlandskih proizvođača hrane kako bi više pažnje posvetili upravljanju alergijskim sastojcima hrane te označavanju alergena za alergične potrošače u cilju smanjenja opasnosti po zdravlje (Surojanametakul i sur., 2012).

Na Slici 15 prikazani su odgovori ispitanika vezani uz navode o mogućoj prisutnosti alergena u hrani. Vidljivo je da za sva četiri tipa navoda („Sadrži orašaste plodove“, „Mogući tragovi orašastih plodova“, „Mogući tragovi orašastih plodova i kikirikija“, „Mogući tragovi kikirikija“) većina ispitanika ne bi koristila namirnice koje bi sadržavale navedene navode.



A- Sadrži orašaste plodove; B- Mogući tragovi orašastih plodova; C- Mogući tragovi orašastih plodova i kikirikija; D- Mogući tragovi kikirikija

Slika 15. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=79) na pitanje „Ako imate alergiju na kikiriki ili bi pripremali obrok za nekoga s alergijom na kikiriki, da li bi koristili namirnice na kojima piše“

Remington i suradnici (2015) proveli su istraživanje rizika od alergijske reakcije kod populacija alergičnih na mlijeko, pšenicu, lješnjake i kikiriki pri unosu različitih kategorija proizvoda na području Velike Britanije s i bez predostrožnog označavanja alergena. Provedena je procjena rizika od unosa alergena pomoću probabilističkih tehnika koja omogućuje procjenu preostalog rizika nakon unosa proizvoda koji nenamjerno sadrži alergen. Na proizvodima s navodom o mogućoj prisutnosti alergena otkrivene su razine glutena u 6,1 % proizvoda, mlijeka u 8,2 %, lješnjaka u 20,9 % i kikirikija u 0,21 % proizvoda. Na proizvodima bez označene prisutnosti alergena pronađene su razine glutena u 3,3 % proizvoda, mlijeka u 2,1 % te lješnjaka i kikirikija u 0 % proizvoda. Procjene rizika provedene su samo za proizvode s pozitivnim analitičkim rezultatima. Provedena je procjena rizika za 39 proizvoda s navodom o mogućoj prisutnosti alergena od kojih je 31 proizvod predstavljao rizik za populaciju s alergijom ukoliko se konzumira. Također, 9 od tih proizvoda je predstavljalo ozbiljnu opasnost za ljudsko zdravlje kod > 10 % simuliranih obroka prehrane za koje se predvidjelo da bi razultirali alergijskom reakcijom. Procjene rizika provedene su za 12 proizvoda koji su bili pozitivni na alergene, ali nisu sadržavali oznaku o prisutnosti alergena od kojih su 3 proizvoda iz tri kategorije predstavljala ozbiljan rizik za ljudsko zdravlje s pretpostavkom da bi izazvali reakciju u 8,7 %, 13 % i 17 % simuliranih obroka prehrane. Tri proizvoda su predstavljala umjereni rizik za alergičnu populaciju s predvidljivom reakcijom kod 2,4 % simuliranih obroka prehrane. Za preostalih šest proizvoda se predvidjelo da bi mogli izazvati alergijsku reakciju kod < 1 % simuliranih obroka prehrane. Ovi rezultati pokazuju da osobe u Velikoj Britanije, kao i u drugim zemljama, koje su alergične na mlijeko, lješnjake i kikiriki trebaju izbjegavati čokolade s pedostrožnim navodom o prisutnosti alergena zbog povećanog rizika od alergijske reakcije. Uz to, ovo istraživanje pokazuje da bi kod alergičnih osoba moglo doći do reakcije ukoliko zanemare predostrožne navode o prisutnosti alergena na deklaracijama proizvoda. Također, istraživanje pokazuje da su neki proizvodi bez predostrožnog navoda o prisutnosti alergena sadržavali dostatne količine nedeklariranih ostataka alergena koji predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje (Remington i sur., 2015).

Marra i suradnici (2017) proveli su istraživanje u Kanadi kojim su nastojali ispitati preferencije potrošača o različitim načinima označavanja hrane. Analizirane su tri različite skupine potrošača s različitim preferencijama, a rezultati su pokazali da se trenutna kanadska regulacija označavanja alergena u hrani može poboljšati primjenom standardiziranih oznaka o predostrožnosti i sigurnosti te edukacijom javnosti o uporabi tih oznaka (Marra i sur., 2017).

Marchisotto i suradnici (2016) proveli su istraživanje potrošača u SAD-u i Kanadi o kupovnim navikama prehrambenih proizvoda koji sadrže različite oblike oznaka o predostrožnosti. Istraživanje je provedeno na 6684 ispitanika s 5507 ispitanika iz SAD-a i 1177 ispitanika iz Kanade. Od ukupnog broja ispitanika, 84,3 % su bili skrbnici djeteta s nutritivnom alergijom, a 22,4 % ispitanika je imalo alergiju na hranu. 71 % ispitanika je izvijestilo o prošlosti iskustva ozbiljne alergijske reakcije. Kupovne navike potrošača varirale su ovisno o formulaciji oznake o predostrožnosti; 11 % ispitanika izjasnilo se da je kupovalo hranu s oznakom „Može sadržavati“, dok se 40 % ispitanika izjasnilo da je kupovalo hranu s oznakom „Proizvedeno u objektu u kojem se također prerađuje“. 29 % ispitanika nije bilo svjesno da se zakonom zahtijeva označavanje primarnih alergena hrane. 46 % ispitanika je bilo nesigurno ili pogrešno uvjeren u to da se oznake o predostrožnosti zahtijevaju zakonom. 37 % ispitanika je smatralo da su predostrožne oznake zasnovane na količini prisutnih alergena u hrani. Iz ovoga istraživanja može se zaključiti da je razumijevanje oznaka o predostrožnosti loše te je potrebno raditi na poboljšanju svijesti te uvođenju smjernica za pomoć potrošačima s nutritivnom alergijom kako bi mogli nesmetano i sigurno kupovati hranu koja se nudi na tržištu (Marchisotto i sur., 2016).

5. ZAKLJUČCI

Obzirom na prikazane rezultate i provedenu raspravu, doneseni su sljedeći zaključci:

1. U svih deset analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca detektirani su potencijalni alergeni kikirikija, a udio određen ELISA metodom kretao se u rasponu od $0,14 \text{ mgkg}^{-1}$ do $1,40 \text{ mgkg}^{-1}$.
2. U analiziranim uzorcima keksa i čajnih peciva iz pekarnica detektirani su potencijalni alergeni kikirikija u devet od deset uzoraka, pri čemu se udio nalazio u rasponu od $0,12 \text{ mgkg}^{-1}$ do $1,07 \text{ mgkg}^{-1}$.
3. Raspon udjela potencijalnih alergena kikirikija, detektiranih u osam analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz slastičarnica, iznosio je od $0,11 \text{ mgkg}^{-1}$ do $0,69 \text{ mgkg}^{-1}$.
4. Od 79 ispitanika, većina (84,8 %) je upoznata s pojmom alergije. 39,2 % ispitanika smatra kako se kikiriki ubraja u skupinu orašastih plodova. 93,7 % ispitanika smatra kako keksi i čajna peciva mogu sadržavati tragove kikirikija te 15,2 % ispitanika i 74,7 % ispitanica ne bi kupili kekse ili čajna peciva koja sadrže kikiriki koji nije deklariran u slučaju da imaju ili poznaju nekoga tko ima alergiju na kikiriki.
5. Od dvadeset i osam analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva, ELISA metodom detektirani su alergeni kikirikija u dvadeset sedam uzoraka pri čemu su samo dva uzorka iz trgovačkog lanca sadržavala navod o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija.

6. LITERATURA

Ahmed, E.M., Young, C.T. (1982) Composition, quality and flavor of peanuts. U: Peanut science and technology (Pattee, H.E., Young, C.T., ured.), Yoakum, Texas, USA: Amer. peanut Res. Educ. Soc., Inc., str. 655-688.

Allan, L. (2016) Food allergy knowledge, attitudes and beliefs among Australian parents. University of Southern Queensland.

Allen, K.J., Taylor, S.L. (2018) The consequences of precautionary allergen labeling: safe haven or unjustifiable burden? *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **6**, 400-407.

Al-Muhsen, S., Clarke, A.E., Kagan, R.S. (2003) Peanut allergy: an overview. *Can. Med. Assoc. J.* **168**, 1279-1285.

Asibuo, J.Y., Akromah, R., Safo-Kantanka, O., Adu-Dapaah, H.K., Ohemeng-Dapaah, S., Agyeman, A. (2008) Chemical composition of groundnut, *Arachis hypogaea* (L) landraces. *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 2203-2208.

Barre, A., Borges, J.-P., Culerrier, R., Rougé, P. (2005a) Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes. *Immunol. Lett.* **100**, 153-158.

Barre, A., Borges, J.P., Rougé, P. (2005b) Molecular modelling of the major peanut allergen Ara h 1 and other homotrimeric allergens of the cupin superfamily: a structural basis for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochimie* **87**, 499-506.

Bernhisel-Broadbent, J., Taylor, S., Sampson, H.A. (1989) Crossallergenicity in the legume botanical family with food hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **84**, 701-709.

Besler, M. (2001) Determination of allergens in foods. *Trends Anal. Chem.* **20**, 662-672.

- Beyer, K., Morrow, E., Li, X.-M., Bardina, L., Bannon, G.A., Burks, A.W., Sampson, H.A. (2001) Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 1077-1081.
- Bock, S.A., Muñoz-Furlong, A., Sampson, H.A. (2001) Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 191-193.
- Bock, S.A., Atkins, F.M. (1989) The natural history of peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**, 900-904.
- Bock, S.A. (1985) Natural history of severe reactions to foods in young children. *J. Pediatr.* **107**, 676-680.
- Boutrif, E. (1995) FAO programmes for prevention, regulation, and control of mycotoxins in food. *Nat. Toxins.* **3**, 322-326.
- Boye, J.I., Danquah, A.O., Thang, C.L., Zhao, X. (2012) Food allergens. U: Food biochemistry and food processing, 2. izd. (Simpson, B.K., Nollet, L.M.L., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G., Hui, Y.H., ured.), John Wiley & Sons, Inc., Danvers, str. 798-819.
- Burks, A.W. (2008) Peanut allergy. *Lancet* **371**, 1538-1546.
- Chang, A.S., Sreedharan, A., Schneider, K.R. (2013) Peanut and peanut products: A food safety perspective. *Food Control* **32**, 296-303.
- Chung, S.-Y., Champagne, E.T. (2001) Association of end-product adducts with increased IgE binding of roasted peanuts. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3911-3916.
- Cobb, W.Y., Johnson, B.R. (1973) Physiochemical properties of peanuts. U: Peanuts: Culture and uses (Wilson, C.T., ured.), Stillwater, Oklahoma, str. 209-256.
- Dannaeus, A., Inganäs, M. (1981) A follow-up study of children with food allergy. Clinical course in relation to serum IgE- and IgG-antibody levels to milk, egg and fish. *Clin. Allergy* **11**, 533-539.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal*. xx(xx):NNNN.

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.

Gallagher, M., Worth, A., Cunningham-Burley, S., Sheikh, A. (2012) Strategies for living with the risk of anaphylaxis in adolescence: qualitative study of young people and their parents. *Prim. Care Respir. J.* **21**, 392-397.

Garcia, V.V., Rubico, S.M., Arenas, R.C., Valmonte, R.D. (1990) Peanut consumption patterns in the Philippines. FAO of the United Nations.

Gayraud, J., Mairesse, M., Fontaine, J.F., Thillay, A., Leduc, V., Rancé, F., Parisot, L., Moneret-Vautrin, D.A. (2009) The prevalence of sensitization to lupin flour in France and Belgium: a prospective study in 5366 patients, by the allergy vigilance network. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* **41**, 17-22.

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

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.

Holaday, C.E., Pearson, J.L. (1974) Effects of genotype and production area on the fatty acid composition, total oil and total protein in peanuts. *J. Food Sci.* **39**, 1206-1209.

Holzhauser, T., Stephan, O., Vieths, S. (2006) Polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods. U: Detecting Allergens in Food (Koppelman, S.J., Hefle, S.L., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 125-143.

- Hourihane, J. (2011) Peanut Allergy. *Pediatr. Clin. N. Am.* **58**, 445-458.
- Hourihane, J., Roberts, S.A., Warner, J.O. (1998) Resolution of peanut allergy: case-control study. *Brit. Med. J.* **316**, 1271-1275.
- Hourihane, J.O. (2002) Recent advances in peanut allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2**, 227-231.
- Hourihane, J.O., Bedwani, S.J., Dean, T.P., Warner, J.O. (1997) Randomised, double blind, crossover challenge study of allergenicity of peanut oils in subjects allergic to peanuts. *Brit. Med. J.* **314**, 1084-1088.
- Husain, Z., Schwartz, R.A. (2012) Peanut allergy: An increasingly common life-threatening disorder. *J. Am. Acad. Dermatol.* **66**, 136-143.
- Husain, Z., Schwartz, R.A. (2013) Food allergy update: more than a peanut of a problem. *Int. J. Dermatol.* **52**, 286-294.
- Jambunathan, R. (1991) Groundnut Quality Characteristics. U: Uses of tropical grain legumes: proceedings of a consultants meeting (Hall, S.D., Sudhir, P., Rajan, V., Sadhana, V., ured.), ICRISAT, Andhra Pradesh, India, str. 267-275.
- Jappe, U., Vieths, S. (2010) Lupine, a source of new as well as hidden food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 113-126.
- Keating, M.U., Jones, R.T., Worley, N.J., Shively, C.A., Yunginger, J.W. (1990) Immunoassay of peanut allergens in food-processing materials and finished foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* **86**, 41-44.
- Krska, R., Welzig, E., Baumgartner, S. (2004) Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 63-65.
- Kukić, S., Markić, B. (2011) Metode, tehnike, postupci i instrumenti znanstvenoistraživačkog rada. *Informatologia* **44**, 159-160.

Kumar Verma, A., Kumar, S., Das, M., Dwivedi, P.D. (2012) A Comprehensive review of legume allergy. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*

Lee, Y.M., Xu, H. (2015) Food allergy knowledge, attitudes and preparedness among restaurant managerial staff. *J. Foodserv. Bus. Res.* **18**, 454-469.

Lopez-Torrejon, G., Salcedo, G., Martin-Esteban, M., Diaz-Perales, A., Pascual, C.Y., Sanchez Monge, R. (2003) Len c 1, a major allergen and vicilin from lentil seeds: protein isolation and cDNA cloning. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 1208-1215.

Marchisotto, M.J., Harada, L., Kamdar, O., Smith, B.M., Wasserman, S., Sicherer, S., Allen, K., Muraro, A., Taylor, S., Gupta, R.S. (2016) Food allergen labeling and purchasing habits in the United States and Canada. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 1-7.

Marra, C.A., Harvard, S., Grubisic, M., Galo, J., Clarke, A., Elliott, S., Lynd, L.D. (2017) Consumer preferences for food allergen labeling. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **13**, 1-11.

Martin, D., Chapman, M. (2001) Prediction of the allergenicity of a molecule. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* **41**, 13-16.

Mason, M.E., Johnson, B., Hamming, M. (1966) Flavor components of roasted peanuts. Some low molecular weight pyrazines and a pyrrole. *J. Agric. Food Chem.* **14**, 454-460.

McWatters, K.H. (1983) Diversified food uses for peanuts. U: Peanuts: production, processing, products, 3. izd. (Woodroof, J.G., ured.), AVI Publishing Company Inc. Connecticut, str. 309-336.

Mittag, D., Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B.K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W.-M., Koppelman, S.J., Knulst, A.C., Helbling, A., Hefle, S.L., van Ree, R., Vieths, S. (2004) Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 1410-1416.

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

- Moneret-Vautrin, D.A., Guerin, L., Kanny, G., Flabbee, J., Frémont, S., Morisset, M. (1999) Cross-allergenicity of peanut and lupine: the risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 883-888.
- Mottern, H.H. (1973) Peanuts and human nutrition. U: Peanuts: Culture and uses (Wilson, C.T., ured.), Stillwater, Oklahoma, str. 593-602.
- Mustorp, S., Engdahl-Axelsson, C., Svensson, U., Holck, A. (2008) Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real time PCR. *Eur. Food Res. Technol.* **226**, 771-778.
- Nowak-Wegrzyn, A. (2006) Immunotherapy for food allergy. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **5**, 23-34.
- Pattee, H.E., Purcell, A.E. (1967) Carotenoid pigments of peanut oil. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **44**, 328-330.
- Pattee, H.E., Purcell, A.E., Johns, E.B. (1969) Changes in carotenoid and oil content during maturation of peanut seeds. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **46**, 629-631.
- Peeters, K.A.B.M., Koppelman, S.J., Penninks, A.H., Lebens, A., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Hefle, S.L., Taylor, S.L., van Hoffen, E., Knulst, A.C. (2009) Clinical relevance of sensitization to lupine in peanut sensitized adults. *Allergy* **64**, 549-555.
- Perry, T.T., Conover-Walker, M.K., Pome's, A., Chapman, M.D., Wood, R.A. (2004) Distribution of peanut allergen in the environment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 973-976.
- 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.

Remington, B.C., Baumert, J.L., Marx, D.B., Taylor, S.L. (2013) Quantitative risk assessment of foods containing peanut advisory labeling. *Food Chem. Toxicol.* **62**, 179-187.

Remington, B.C., Baumert., J.L., Blom, W.M., Houben, G.F., Taylor, S.L., Kruizinga, A.G. (2015) Unintended allergens in precautionary labelled and unlabelled products pose significant risks to UK allergic consumers. *Allergy* **70**, 813-819.

Robertson, O.N., Hourihane, J.O., Remington, B.C., Baumert, J.L., Taylor, S.L. (2013) Survey of peanut levels in selected Irish food products bearing peanut allergen advisory labels. *Food Add. Contam.* **30**, 1467-1472.

Sampson, H.A., Louis Mendelson, M.D., Rosen, J.P. (1992) Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children in adolescents. *New Engl. J. Med.* **372**, 380-384.

Schnadt, S., Pfaff, S. (2016) Hidden allergens in processed food: an update from consumer`s point of view. *Bundesgesundheitsbl* **59**, 878-888.

Sheth, S.S., Wasserman, S., Kagan, R., Alizadehfar, R., Primeau, M.-N., Elliot, S., Pierre, Y., Wickett, R., Joseph, L., Harada, L., Dufresne, C., Allen, M., Allen., M., Benrejeb Godefroy, S., Clarke, A.E. (2010) Role of food labels in accidental exposures in food-allergic individuals in Canada. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **104**, 60-65.

Sicherer, S.H., Munoz-Furlong, A., Wesley Burks, A., Sampson, H.A. (1999) Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 559-562.

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. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **133**, 291-307.

Stansbury, M.F., Field, E.T., Guthrie, J.D. (1950) The tannin and related pigments in the red skins (testa) of peanut kernels. *J. Am. Oil. Chemists' Soc.* **27**, 317-321.

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. (2006) The nature of food allergy. U: Detecting allergens in food, (Koppelman, S.J., Hefle, S.L., ured.), Woodhead Publishing Ltd, Abington, str. 3-20.

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

Taylor, S.L., Nordlee, J.A., Niemann, L.M., Lambrecht, D.M. (2009) Allergen immunoassays -considerations for use of naturally incurred standards. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 83-92.

Uredba (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani (2011) *Službeni list* Europske Unije.

Wen, H.-W., Borejsza-Wysocki, W., DeCory, T.R., Durst, R.A. (2007) Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **6**, 47-58.

Willak-Janc, E., Sikorska-Szaflik, H. (2016) Tragic outcome of peanut allergy. *Indian Pediatr.* **53**, 746.

Woodroof, J.G. (1983) Peanuts production, processing, products, 3 izd., The AVI Publishing Co., Inc., Westport.

Yeung, J. (2006) Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in foods. U: Detecting allergens in food (Koppelman, S.J., Hefle, S.L., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 109-124.

Yu, J., Mohawed, S.M., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E. (2003) Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 1334-1342.

7. PRILOZI

Prilog 1. Upitnik o kikirikiju

Upitnik o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije

Poštovani,
pred Vama je kratki upitnik osmišljen u svrhu izrade diplomskog rada na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Svrha upitnika je prikupiti stavove i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija, 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) Grad
- b) Selo

2. Alergije

2.1. Alergija je:

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

2.2. Jeste li alergični na pelud? (Ako DA, na što?) _____

2.3. Imate li nutritivnu alergiju? (Ako DA, na što?) _____

3. Kikiriki

3.1. Kikiriki je:

- a) Orašasti plod
- b) Leguminoza (mahunarka)
- c) Žitarica
- d) Voće

3.2. U kojem obliku najčešće konzumirate kikiriki?

- a) Svježi iz ljuske
- b) Prženi iz konzerve
- c) Kao komponenta obroka (grickalice, kikiriki maslac, umaci)
- d) Ne konzumiram kikiriki

3.3. Kupujete li kekse ili čajna peciva na prodajnim mjestima poput slastičarnice, pekarnice ili trgovačkog lanca?

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

3.4. Smatrate li da keksi ili čajna peciva mogu sadržavati tragove kikirikija? DA NE

3.5. Ako imate ili poznajete nekoga tko ima alergiju na kikiriki, da li bi kupili kekse ili čajna peciva koja sadrže kikiriki koji nije deklariran? DA NE

3.6. Ako imate ili poznajete nekoga tko ima alergiju na kikiriki, da li bi konzumirali kekse ili čajna peciva sa navodom „mogući tragovi kikirikija“? DA NE

3.7. Ukoliko ste alergični na orašaste plodove ili pelud, jeste li izbacili iz prehrane kikiriki?
DA NE

3.8. Ako imate alergiju na kikiriki ili bi pripremali obrok za nekoga s alergijom na kikiriki, da li bi koristili namirnice na kojima piše:

- | | | |
|--|----|----|
| a) Sadrži orašaste plodove | DA | NE |
| b) Mogući tragovi orašastih plodova | DA | NE |
| c) Mogući tragovi orašastih plodova i kikirikija | DA | NE |
| d) Mogući tragovi kikirikija | DA | NE |

Hvala na ispunjavanju upitnika!

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Martina Tolvajčić

Ime i prezime studenta