

# Određivanje alergena kikirikija ELISA metodom

---

Špalj, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:076051>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Sara Špalj**

6804/PT

**ODREĐIVANJE ALERGENA KIKIRIKIJA ELISA  
METODOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Analitika prehrambenih proizvoda

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

**Zagreb, 2017.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**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 ELISA metodom**

***Sara Špalj, 0058204232***

## **Sažetak:**

Cilj ovog istraživanja bio je primjenom ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) testa odrediti udio potencijalnih alergena kikirikija u četiri uzorka kakaovog praha i četiri uzorka instant kakaovih proizvoda različitih proizvođača te ih usporediti s navodima u okviru informacija o hrani vezanim uz prisustvo alergena. U šest od ukupno osam analiziranih uzoraka su detektirani alergeni kikirikija. Udio alergena kikirikija u uzorcima kakaovog praha se kretao u rasponu od 0,37 do 0,64 mgkg<sup>-1</sup>, a u uzorcima instant kakaovih proizvoda u rasponu od 0,14 do 0,26 mgkg<sup>-1</sup>. Najviši udio alergena kikirikija (0,64 mgkg<sup>-1</sup>) je detektiran u uzorku kakaovog praha "KP<sub>4</sub>" pri čemu na deklaraciji proizvoda nije bio prisutan navod koji se odnosi na prisustvo alergena kikirikija.

**Ključne riječi:** alergeni kikirikija, ELISA, informacija o hrani

**Rad sadrži:** 27 stranica, 7 slika, 5 tablica, 56 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

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

**Datum obrane:** 19. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Quality Control**  
**Laboratory for Food Quality Control**

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

**Determination of peanut allergens by ELISA method**

***Sara Špalj, 005820423***

### **Abstract:**

The aim of this study was to determine the content of potential peanut allergens in four samples of cocoa powder and four samples of instant cocoa products from different manufacturers using the ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) test and compare the results with the food information claims related to the presence of allergens. Peanut allergens were detected in six out of eight analysed samples. In samples of cocoa powder peanut allergens were determined in the range from 0,37 to 0,64 mgkg<sup>-1</sup> and in samples of instant cocoa products in the range from 0,14 to 0,26 mgkg<sup>-1</sup>. The highest content of peanut allergens (0,64 mgkg<sup>-1</sup>) was determined in the sample of cocoa powder "KP<sub>4</sub>", and product did not contain any advisory label regarding the presence of peanut allergens.

**Keywords:** ELISA, food information, peanut allergens

**Thesis contains:** 27 pages, 7 figures, 5 tables, 56 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD. Ksenija Marković, Associate Professor

**Defence date:** September 19<sup>th</sup> 2017

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ALERGIJE NA HRANU.....	2
2.1.1. Mehanizam alergijske reakcije .....	2
2.1.2. Nutritivni alergeni.....	3
2.2. ALERGIJA NA KIKIRIKI .....	4
2.2.1. Alergeni kikirikija.....	6
2.3. OZNAČAVANJE ALERGENA U HRANI.....	7
2.3.1. Alergeni i zakonska regulativa. ....	7
2.3.2. Navodi u okviru informacija o hrani koji se odnose na alergene.....	7
2.4. ELISA METODA U ODREĐIVANJU NUTRITIVNIH ALERGENA .....	9
2.4.1. Općenito o ELISA metodi. ....	9
2.4.2. Vrste ELISA testova.....	9
2.4.3. Komercijalno dostupni ELISA testovi za određivanje alergena kikirikija.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1. MATERIJAL.....	12
3.1.1. Uzorci .....	12
3.1.2. Laboratorijska oprema i pribor.....	12
3.1.3. Reagensi .....	14
3.2. METODE RADA .....	14
3.2.1. Priprema otopina reagensa .....	14
3.2.2. Priprema otopina uzoraka .....	15
3.2.3. ELISA test .....	15
3.2.3.1. Princip određivanja .....	15
3.2.3.2. Postupak određivanja.....	16
3.2.4. Obrada podataka .....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	19
5. ZAKLJUČAK .....	22
6. LITERATURA.....	23

## 1. UVOD

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća alergije na hranu predstavljaju ozbiljan problem javnog zdravstva zbog njihove povećane učestalosti. Alergije značajno utječu na kvalitetu života osoba koje od njih pate s obzirom na njihovu prirodu i potencijalnu opasnost po život senzibiliziranih pojedinaca. Budući da je strogo pridržavanje izbjegavanja konzumacije hrane koja sadrži alergene najvažnija preventivna mjera, od izrazitog je značaja da prehrambeni proizvodi budu jasno i nedvosmisleno označeni (Van Hengel, 2007).

Keksi i čokolade su prehrambeni proizvodi u kojima se često kao sastojci koriste kikiriki i lješnjaci radi postizanja specifičnog okusa, međutim alergeni kikirikija također mogu biti prisutni u hrani i uslijed križne kontaminacije prilikom korištenja zajedničkih proizvodnih pogona, pri čemu se proizvođači moraju pridržavati dobre proizvođačke prakse kako bi pravilno naveli mogućnost nenamjernog prisustva alergeni sastojaka u hrani (Stein i sur., 2005).

Budući da su mnoge studije pokazale kako je unos hrane koja sadrži čak 0,1 mg proteina kikirikija sposoban izazvati simptome alergijske reakcije u senzibiliziranih pojedinaca, koje u nekim slučajevima mogu biti opasne po život, razvijene su mnoge metode utvrđivanja njihovog prisustva u hrani (Hourihane i sur., 1997; Taylor i sur., 2002; Wensing i sur., 2002). Ove metode moraju biti visoko osjetljive i specifične, sposobne detektirati prisustvo alergena u tragovima te je poželjno da daju rezultate u kratkom vremenu i po pristupačnoj cijeni (Lexmaulová i sur., 2013). Za detekciju alergena u prehrambenim proizvodima često se koriste imunoenzimske metode kao što je ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metoda, koja se temelji na specifičnom vezanju antitijela i antigena (proteini kikirikija).

Cilj ovog rada bit će odrediti udio potencijalnih alergena kikirikija u četiri uzorka kakaovog praha i četiri uzorka instant kakaovih proizvoda primjenom ELISA testa.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. ALERGIJE NA HRANU**

#### 2.1.1. Mehanizam alergijske reakcije

Alergija na hranu se definira kao pretjerana reakcija imunskog sustava što se opetovano javlja nakon izloženosti određenoj vrsti hrane (Johannson i sur., 2004). Unatoč velikoj izloženosti potencijalnim alergenima kojima smo izloženi prilikom konzumiranja hrane, samo mali broj genetski predisponiranih osoba razvije alergijsku reakciju na hranu. Procjenjuje se da u zapadnim zemljama 1-10 % ukupne populacije ima neku vrstu alergije na hranu, a novija istraživanja ukazuju i na porast prevalencije nutritivnih alergija (Štimac i sur., 2014).

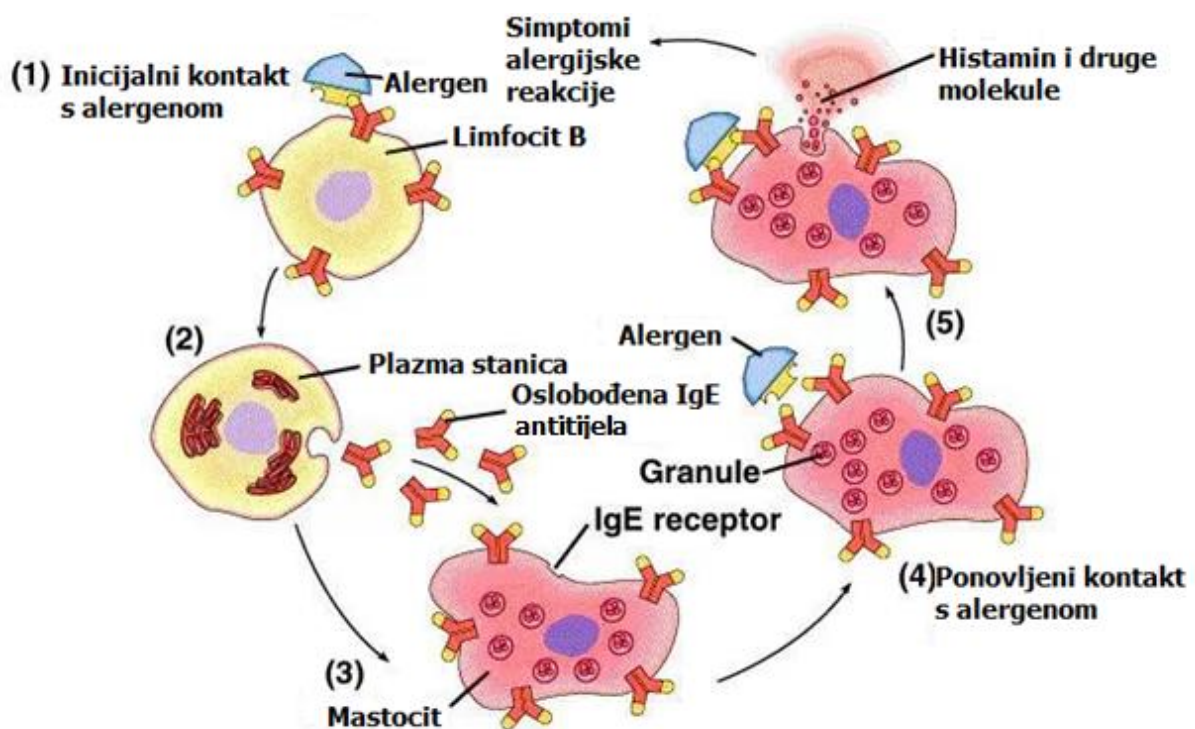
Mehanizam alergijskih reakcija može biti posredovan imunoglobulin E antitijelima (IgE), odnosno može biti IgE zavisna (reaginski tip reakcije) i IgE nezavisna (imunokompleksni, kasni i rijetko citotoksični tip reakcije) (Vujošević i sur., 2002). Bitno je od alergije na hranu razlikovati intoleranciju na hranu budući da je ona neimunološka reakcija koja može biti uzrokovana različitim svojstvima hrane ili osjetljivošću domaćina (primjer su metaboličke bolesti, poput intolerancije na laktozu) (Sampson, 1999; 2004).

Imunološka reakcija započinje kontaktom s alergenom koji se najčešće odvija preko sluznice probavnog sustava koja predstavlja ulazna vrata, ali i barijeru za antigene (alergene) koji se unose hranom. Ostali mogući načini senzibilizacije su putem dišnog sustava i kože (Šadić i Maltez Ćatić, 2013).

U slučaju imunskog odgovora koji je posredovan IgE antitijelima, prilikom prvog kontakta s antigenom (alergenom) iz hrane dolazi do senzibilizacije domaćina. U kontaktu antigena s limfocitima B dolazi do njihove aktivacije i diferencijacije aktiviranih B limfocita. Limfociti B imaju na svojoj površini antitijela kao stanične receptore. Kada se za receptor (antitijelo) veže odgovarajući antigen on uzrokuje aktivaciju limfocita B, odnosno započinje njihovo dijeljenje te stvaranje plazma stanica (koje izlučuju antitijela) i stanica s pamćenjem. Stanice s pamćenjem će ostati u krvotoku te će isti antigen prepoznati pri svakom sljedećem kontaktu, a imunski će odgovor tada biti brži i učinkovitiji (Andreis i sur., 2010). Plazma stanice će izlučiti antitijela IgE za specifični antigen u krvotok, koja će se vezati na membranu efektorskih stanica imunskog sustava (mastocita i bazofila) preko visokoafinitetnog receptora te uzrokovati njihovu aktivaciju (Pevec i sur., 2011).

Aktivacija mastocita i bazofila je središnje zbivanje u nastanku alergijske upale, a iz aktiviranih stanica se djelovanjem signalne kaskade oslobađaju različiti upalni medijatori koji dovode do

alergijske reakcije (Slika 1). Razlikujemo ranu i kasnu alergijsku reakciju. Kod rane se simptomi najčešće pojavljuju brzo, unutar prvih 30 minuta od ingestije alergena, uslijed osobađanja primarnih upalnih medijatora (histamin, triptaza, citokini) iz granula pohranjenih u efektorskim stanicama. Histamin je glavni upalni medijator alergijske reakcije jer povećava propusnost krvnih žila, a triptaza razgrađuje komponente vezivnog tkiva, čime omogućavaju ulazak upalnih medijatora i stanica na mjesto reakcije (Pevac i sur., 2011). Histamin u konačnici može uzrokovati različite upalne procese, svrbež, kontrakcije glatkog mišićja krvnih žila, probavnog i dišnog sustava (Lehrer i sur., 1996). U nekim slučajevima nakon 6 do 72 sata od ingestije alergena dolazi do kasne alergijske reakcije. Nju uzrokuju novonastali sekundarni upalni medijatori, nastali nakon reagiranja antigena i antitijela, a među najvažnijima se navode prostaglandini, leukotrijeni, citokini i kemokini koji novače i aktiviraju druge upalne stanice (Pevac i sur., 2011).



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz mehanizma alergijske reakcije (Lewis, 1998)

### 2.1.2. Nutritivni alergeni

Nutritivni alergeni (antigeni) su po kemijskom sastavu najčešće proteini molekulske mase iznad 10 000 Da ili tvari vezane na proteine (hapteni) (Martinis, 2004). Hapteni su male molekule koje same po sebi nisu imunogeni (ne izazivaju imunosni odgovor), već to postaju tek nakon vezanja na molekule nosače koje su imunogeni (proteini) (Andreis i sur., 2010).



Prilikom kontakta s antigenom (alergenom), antitijela se specifično vežu za antigenske determinante odnosno epitope, a dio antitijela odgovoran za vezanje na epitop se naziva paratop (Andreis i sur., 2010). Veza epitopa antigena i paratopa antitijela ostvaruje se po principu strukturne komplementarnosti i to nekovalentnim interakcijama (ionske, vodikove, hidrofobne, Van der Waalsove) (Schroeder i Cavacini, 2010).

Intenzitet potencijalnog alergnog djelovanja se razlikuje između proteina, polisaharida i lipida, pri čemu su jači alergeni proteina i polisaharida nego lipida (Martinis, 2004).

Najčešći nutritivni alergeni koji su odgovorni za 90 % reakcija preosjetljivosti na hranu kod djece su proteini prisutni u mlijeku, jajima, kikirikiju, soji i pšenici, dok su kod adolescenata i odraslih za 85 % reakcija preosjetljivosti na hranu odgovorni proteini kikirikija, ribe, školjkaša i orašastih plodova (Sampson, 1999).

Pojedini alergeni mogu imati homologne proteine ili strukturno vrlo slične epitope što dovodi do njihovog vezanja s istim IgE protutijelima, a ta se pojava naziva križna reakcija. Zbog toga osobe koje su hipersenzibilizirane na jedan alergen, mogu reagirati i na drugi, a da prije toga nisu s njime došle u kontakt (Brandtzaeg, 2011). Primjerice, kod osoba s alergijom na pelud breze moguća je i križna reakcija na alergene kikirikija zbog strukturne sličnosti alergena kikirikija Ara h 5 i alergena breze Bet v 2 (Wang i sur., 2013).

## **2.2. ALERGIJA NA KIKIRIKI**

Kikiriki (*Arachis hypogaea*) je jednogodišnja biljka koja spada u porodicu leguminoza, odnosno mahunarki (*Fabacea*). Izvorno kikiriki potječe iz Južne Amerike, a danas je njegova konzumacija raširena u cijelom svijetu. Konzumiraju se oljuštene cijele pržene jezgre kikirikija ili samljevene u različitim vrstama snack proizvoda i proizvoda s kakao dijelovima radi postizanja specifičnog okusa. Cijela zrna se također prerađuju za dobivanje ulja i maslaca od kikirikija.

Mehanizam nastanka alergije na proteine kikirikija još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no poznato je da je to jedan od najčešćih oblika reakcije posredovane IgE (EFSA, 2014).

Obično se alergija na kikiriki prvi puta javlja u ranoj životnoj dobi. Prema nekim istraživanjima 89 % alergijskih ispitanika mlađe je od 18 godina, a prosječna dob oboljelih je 5 godina. Većina djece doživljava prvu alergijsku reakciju na proteine kikirikija u dobi od 14 mjeseci, a u 74 % slučajeva prve reakcije pojavljuju se pri prvom poznatom izlaganju alergenima (Sicherer, 2001). Alergija na kikiriki je češća kod djece nego kod odraslih (Grundy i sur., 2002; Hourihane,

2011). U posljednjih nekoliko desetljeća učestalost i ozbiljnost alergijskih reakcija na kikiriki je u porastu, a tome pridonosi i njegovo sve ranije uvođenje u prehranu kod djece. Djeca su osobito ugrožena skupina budući da nedeklarirani tragovi kikirikija uslijed križne kontaminacije mogu biti skriveni u čokoladi, snack proizvodima i keksima (Husain i Schwartz, 2012).

Budući da još uvijek ne postoji dovoljno učinkovita terapija lijekovima za tretiranje alergije na kikiriki, već je naglasak na prevenciji kontakta s dotičnim alergenom, svakodnevica alergične osobe se sastoji od pažljivog čitanja deklaracija prehrambenih proizvoda kako bi se izbjegla konzumacija hrane koja sadrži alergen.

Alergijski odgovor može uslijediti već nekoliko minuta nakon ingestije alergena, a ovisno o dozi i osjetljivosti pojedinca može varirati od blage iritacije kože do po život opasne anafilaktičke reakcije. Najčešće zabilježeni simptomi su osip, crvenilo i otok kože, suženje očiju, nosa ili otežano disanje koji ne traju duže od jednog dana. U nekim slučajevima može se javiti i najteži oblik alergijske reakcije, a to je anafilaktički šok koji ukoliko se ne potraži hitna medicinska pomoć može imati fatalan ishod. Kao posljedica anafilaktičkog šoka, uslijed oticanja sluznice dolazi do značajnog suženja i/ili zatvaranja dišnih puteva, nesvjestice uslijed nedostatka kisika, značajnog pada krvnog tlaka, disritmije i prestanka rada srca, kome i u konačnici smrti (Bošnjir i sur., 2009). O ozbiljnosti alergijskih reakcija svjedoči i podatak da je u Velikoj Britaniji od 37 zabilježenih smrtnih slučajeva izazvanih hranom između 1992. i 2000. godine, deset uzrokovala konzumacija kikirikija (Pumphrey, 2000).

Neki autori ukazuju i na slučajeve prerastanja alergije na kikiriki (Hourihane i sur., 1998; Vander Leek i sur., 2000; Spergel i sur., 2000). Provedena studija sugerira da tolerancija može biti postignuta nakon 4 do 5 godina izbjegavanja konzumacije hrane koja sadrži alergen (Skolnick i sur., 2001). Prema podacima nekoliko studija, tolerancija se postiže kod otprilike 20 % osoba, no zabilježeni su i slučajevi ponovne senzitivizacije (Fleischer i sur., 2004).

Osim genetskih predispozicija, kulturološke prehrambene navike i priprema hrane također predstavljaju važan čimbenik u prevalenciji nutritivnih alergija u svijetu. Uspoređujući Kinu i SAD, gdje je jednaka konzumacija kikirikija po glavi stanovnika, u Kini gotovo da i nije prisutna alergijska reakcija na kikiriki (Hill i sur., 1999). Kinezi uglavnom pripremaju kuhani kikiriki ili pržen u ulju, dok Amerikanci jedu isključivo suho prženi kikiriki u čijem procesu pripremanja temperatura od 180 °C stupnjeva pridonosi alergenosti proteina kikirikija (Chung i sur., 2003).

### 2.1.1. Alergeni kikirikija

Alergeni sastojci kikirikija su njegovi proteini, čiji udio u jezgri kikirikija iznosi 24-30 % (Lexmaulová i sur., 2013). Jezgra kikirikija sadrži više od 50 različitih proteina, od kojih njih 19 vezuje IgE iz krvnog seruma ispitanika alergičnih na kikiriki (Clarke i sur., 1998).

Proteini kikirikija Ara h 1 i Ara h 2 su identificirani još početkom devedesetih godina (Burks i sur., 1991b; 1992a), te su najčešće proučavani. Proteini Ara h 1, Ara h 2 i Ara h 3 se smatraju glavnim alergenima jezgre kikirikija (Burks i sur., 1998). Ara h 1 čini otprilike 20 %, a Ara h 2 10 % svih proteina jezgre kikirikija (De Meulenaer i sur., 2005). Ara h 1 i Ara h 2 su prepoznati od strane IgE kod 70-90 % osoba alergičnih na kikiriki, a Ara h 3 je prepoznat od strane 45 % osoba alergičnih na kikiriki (Flinterman i sur., 2007). Svi alergenii kikirikija s pripadajućim molekulskim masama su prikazani u tablici 1.

Proteini kikirikija nisu osjetljivi na uobičajene postupke termičkog procesiranja hrane te zadržavaju svoj alergeni karakter i nakon zagrijavanja. Vezivna svojstva proteina kikirikija za IgE pojačavaju se nakon prženja, vjerojatno zbog strukturnih modifikacija molekula proteina (EFSA, 2004.) Za razliku od prženja, hidrolizom s proteolitičkim enzimima osjetljivost IgE na alergene kikirikija Ara h 1, Ara h 2 i Ara h 3 je smanjena (Cabanillas i sur., 2011).

Tablica 1. Alergeni kikirikija (*Arachis hypogaea*) (EFSA, 2014)

<b>Alergen</b>	<b>Biokemijski naziv</b>	<b>Superobitelji/obitelji</b>	<b>Molekulska masa <sup>(a)</sup></b>
Ara h 1	7S Globulin (tip vicilina)	Kupin	64
Ara h 2	Konglutin (2S albumin)	Prolamin	17
Ara h 3	11S Globulin (legumin)	Kupin	60.34 (fragment)
Ara h 5	Profilin	Profilin	15
Ara h 6	Konglutin (2S albumin)	Prolamin	15
Ara h 7	Konglutin (2S albumin)	Prolamin	15
Ara h 8	PR-10	Bet-v1	17
Ara h 9	ns-LTP	Prolamin	9.8
Ara h 10	Oleozin	Oleozin	16 <sup>(b)</sup>
Ara h 11	Oleozin	Oleozin	14 <sup>(b)</sup>
Ara h 12	Defenzin	–	8 kDa (reducirajuća) 12 kDa (nereducirajuća) 5.184 kDa (masa)
Ara h 13	Defenzin	–	8 kDa (reducirajuća) 11 kDa (nereducirajuća) 5.472 kDa (masa)

(a): Molekulska masa određena SDS-PAGE metodom

(b): kDa.

## **2.3. OZNAČAVANJE ALERGENA U HRANI**

### 2.3.1. Alergeni i zakonska regulativa

Označavanje, reklamiranje i prezentiranje hrane su najvažniji oblici komunikacije subjekta u poslovanju s hranom (koji hranu stavlja na tržište) s potrošačem, te su ujedno i jedno od najsloženije zakonski reguliranih područja vezanih uz hranu. Davanje informacija o sadržaju prehrambenih proizvoda unutar Europske unije regulirano je Uredbom (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća o informiranju potrošača o hrani, a koja se od 13. prosinca 2014. primjenjuje i u Hrvatskoj. Uredba je donesena kako bi se pojednostavili postojeći propisi o označavanju hrane te pružile potrebne informacije potrošačima o sastojcima prisutnim u prehrambenim proizvodima (Uredba EU, 2011).

Informacije o hrani podrazumijevaju skup informacija koje se odnose na hranu, a dostupne su krajnjem potrošaču putem etiketa, drugog popratnog materijala ili na neki drugi način, uključujući sredstva moderne tehnologije ili verbalne komunikacije. Subjekti u poslovanju hranom se moraju pridržavati prakse poštenog informiranja, odnosno potrošaču pružiti informacije o hrani koje su točne, jasne, lako razumljive te nisu obmanjujuće (Uredba EU, 2011).

Pružanjem informacija o hrani se treba postići visoka razina zaštite zdravlja i interesa potrošača, a važan aspekt za zdravlje potrošača koji pate od alergija i intolerancija na hranu predstavlja označavanje sastojaka prehrambenih proizvoda koji mogu izazvati alergijsku reakciju (Uredba EU, 2011). Prehrambeni proizvodi koji sadrže alergene sastojke, a koji nisu navedeni na deklaraciji proizvoda, nisu sigurni za skupinu potrošača s alergijom na hranu, te se kao takvi ne smiju stavljati na tržište (Van Hengel, 2007).

Ako alergeni sastojak ili njegov derivat nije jasno naveden u imenu ili to ne proizlazi iz same vrste proizvoda, alergen se mora jasno navesti u popisu sastojaka proizvoda. Naziv potencijalnog alergena mora biti naglašen uporabom vrste pisma koje se jasno razlikuje od vrste pisma kojim je pisan ostatak popisa sastojaka, primjerice različitim slovima, stilovima ili pozadinskim bojama (Uredba EU, 2011).

### 2.3.2. Navodi u okviru informacija o hrani koji se odnose na alergene

U sklopu dobrovoljnih informacija o hrani subjekti u poslovanju hranom mogu dobrovoljno iz predostrožnosti informirati potrošače o mogućoj i nenamjernoj prisutnosti u hrani tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili intolerancije (Uredba EU, 2011). Različiti izrazi služe za navođenje i upozoravanje kao što su primjerice: sadrži tragove (alergen), može sadržavati

(alergen), proizvedeno na proizvodnoj liniji gdje i (alergen), proizvodi se u tvornici koja također koristi (alergen) (Kolarić Kravar, 2016).

Ovakve informacije mogu biti prisutne kod proizvoda u kojima alergeni nisu sastojci nego u njemu mogu biti prisutni uslijed križne kontaminacije prilikom upotrebe zajedničkih proizvodnih pogona. Ovakav način označavanja vodi nedosljednom pristupu od strane subjekta u poslovanju hranom te potencijalno ukazuje i na nemogućnost kontrole tehnoloških procesa od strane proizvođača, te lošu proizvođačku praksu u proizvodnji i skladištu (Van Hengel, 2007).

Potrošači žele jasne i dosljedne izjave s obzirom na deklariranje prisutnosti alergena u hrani, a izrazi poput "Proizvodi se u tvornici u kojoj se koristi (alergen)" nisu razumljivi širokoj populaciji potrošača jer zahtijevaju poznavanje tehnološkog procesa kako bi se mogla procijeniti potencijalna mogućnost kontaminacije te u konačnici dovode potrošača u dilemu ima li alergena u proizvodu ili nema (Van Hengel, 2007).

Potrošači s alergijama na hranu se zbog prekomjernog nepotrebnog korištenja oznaka predostrožnosti od strane proizvođača često susreću s vrlo ograničenim izborom "sigurnih" prehrambenih proizvoda, odnosno proizvoda koji prema deklaraciji ne sadrže potencijalne alergene. Postoji mogućnost da će u tom slučaju potrošači koji pod svaku cijenu žele izbjeći konzumaciju hrane koja sadrži alergene u konačnici i odustati od kupovine proizvoda (Van Hengel, 2007).

Druga mogućnost je da potrošači pogrešno tumače i povezuju različite izraze vezane uz moguće prisustvo alergena s različitim razinama rizika (Kolarić Kravar, 2016). Istraživanje provedeno 2009. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu je pokazalo kako veći broj roditelja djece koje pate od alergija na hranu izbjegava kupovinu proizvoda s navodom "Može sadržavati (alergen)", u odnosu na proizvod s navodom "Može sadržavati tragove (alergen)" (Noimark i sur., 2009).

Još jedna mogućnost je ignoriranje upozorenja o mogućem prisustvu alergena od strane potrošača. Istraživanje iz 2007. godine je pokazalo kako se potrošači sve češće odlučuju ignorirati ovu vrstu navoda na deklaraciji te se tako potencijalno izlažu nepotrebnom riziku (Hefle i sur. 2007). Za potrošače su najprihvatljivije jasne negativne ("Nije prikladno za alergične osobe") ili pozitivne ("Ovaj proizvod je bez (alergen)") izjave na deklaraciji proizvoda (Van Hengel, 2007).

Upotreba oznaka predostrožnosti trenutačno nije regulirana te još nije dokazano u kojoj mjeri prehrambeni proizvodi s takvim navodima na deklaraciji doista i sadrže alergene sastojke i

upotrebljava li se ova vrsta označavanja ispravno kao posljednje sredstvo, ili kako bi proizvođači hrane prikrili loše higijenske uvjete i time se ogradili od odgovornosti i izbjegli potencijalne tužbe od strane potrošača (Van Hengel, 2007).

## **2.4. ELISA METODA U ODREĐIVANJU NUTRITIVNIH ALERGENA**

### 2.4.1. Općenito o ELISA metodi

Imunoenzimski ELISA test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) služi za kvalitativno i kvantitativno određivanje antigena. Temelj ELISA metode je reakcija specifičnog vezanja antitijela i analiziranog antigena iz uzorka, te spektrofotometrijsko mjerenje nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje (Butorac i sur., 2013).

U osnovi ELISA metode postoje dvije reakcije: imunološka i kemijska. Imunološku reakciju predstavlja reakcija antigena i antitijela koja nije vidljiva, a reakcija enzima i supstrata predstavlja kemijsku reakciju, pri čemu se bezbojni supstrat oboji i reakciju učini vidljivom i mjerljivom (Engvall i Perlmann, 1971).

ELISA je vrlo osjetljiva i selektivna metoda koja omogućuje kvantifikaciju analita prisutnog i u vrlo niskim koncentracijama u analiziranom uzorku, zbog čega ima raširenu primjenu u prehrambenoj industriji u analizama kojima se utvrđuje odgovara li sastav prehrambenog proizvoda njegovoj deklaraciji i je li u skladu sa zakonskim propisima. ELISA testovi se također koriste u detekciji kontaminanata, alergena, GMO-a te utvrđivanju autentičnosti prehrambenih proizvoda.

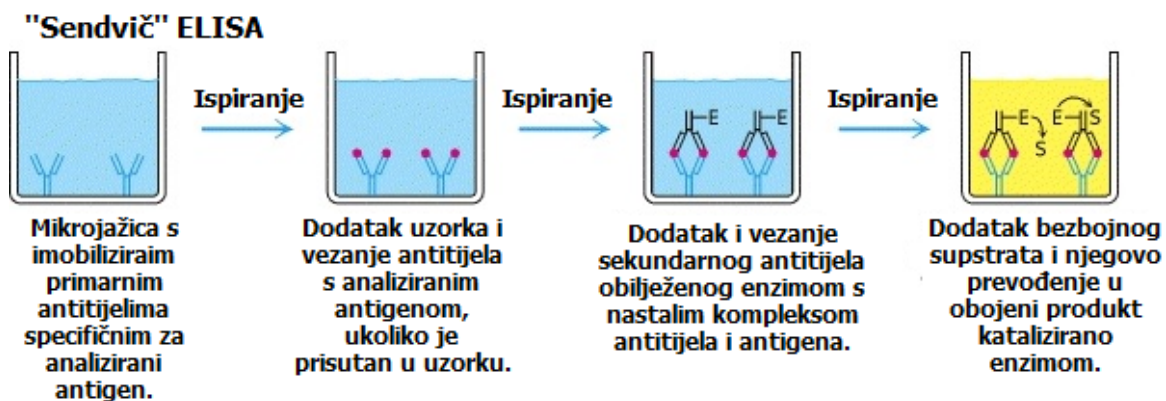
ELISA test omogućuje detekciju analita koji može biti protein, ugljikohidrat ili lipidni spoj za koji je moguće proizvesti odgovarajuća antitijela (Butorac i sur. 2013). Koristi se pri određivanju alergena u hrani kao što su mlijeko, kikiriki, lješnjak i jaja te kontaminaciju mikroorganizmima, pesticidima i antibioticima (Chen i sur., 2012).

### 2.4.2. Vrste ELISA testova

Postoji više različitih tehnika imunološkog određivanja pomoću ELISA testa: direktna ili "sendvič", indirektna, konkurentna i nova višestruka i prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča (Butorac i sur., 2013). U analizi prehrambenih proizvoda se najčešće primjenjuju setovi koji se temelje na "sendvič" ELISA tehnici i konkurentnoj ELISA tehnici.

## 1) Direktna ili "sendvič" ELISA

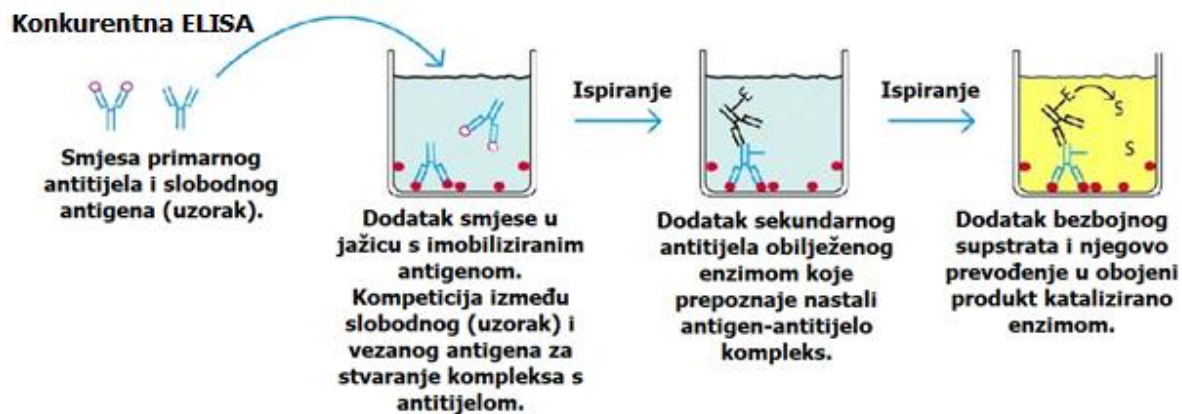
Kod ovog oblika testa primarno antitijelo specifično za analizirani alergen je imobilizirano na dnu mikrotitarske ploče. Za njega će se vezati antigen iz analiziranog uzorka, ukoliko je u njemu prisutan. Nakon koraka ispiranja kojim se uklanja nevezani antigen, dodaje se konjugat koji sadrži sekundarna antitijela specifična za analizirani antigen koja su obilježena enzimom. Ova antitijela se vežu za imobilizirani kompleks antitijela i antigena. Nakon dodatka bezbojnog supstrata dolazi do njegovog prevođenja u obojeni produkt koje je katalizirano enzimom (Slika 2). Intenzitet nastalog obojenja reakcijske otopine je proporcionalan količini prisutnog antigena u analiziranom uzorku (Tizard, 1996).



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz "sendvič" ELISA testa (Anonymous 1, 2015)

## 2) Konkurentna ELISA

Kod ovog oblika ELISA testa antigen je imobiliziran za dno jažice mikrotitarske ploče. U pojedinu jažicu se dodaje određena količina primarnog antitijela i slobodnog antigena (iz uzorka), čime dolazi do kompeticije između slobodnog antigena (iz uzorka) i imobiliziranog antigena za stvaranje kompleksa s antitijelom. Prednost za vezanje s primarnim antitijelom ima antigen iz analiziranog uzorka, ukoliko ga u njemu ima, jer prvi dolazi u kontakt s antitijelom. Nakon koraka ispiranja kojim se uklanja nevezani antigen dodaje se sekundarno antitijelo obilježeno enzimom koje prepoznaje i veže se za nastali antigen-antitijelo kompleks. Dodatkom bezbojnog supstrata za enzim dolazi do njegovog prevođenja u obojeni produkt koje katalizira enzim (Slika 3). Ukoliko u uzorku nisu prisutni antigeni, antitijelo obilježeno enzimom pokazuje maksimalno vezanje za imobilizirani antigen, što rezultira velikom apsorpcijom nastalog obojenog produkta. Što je veća količina slobodnog antigena u uzorku veći je i stupanj inhibicije vezanja antitijela obilježenih enzimom za imobilizirani antigen. Koncentracija analiziranog antigena je u ovom slučaju obrnuto proporcionalna intenzitetu obojenja otopine (Besler i sur., 2002).



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz konkurentnog ELISA testa (Anonymous 1, 2015)

#### 2.4.3. Komercijalno dostupni ELISA testovi za određivanje alergena kikirikija

U današnje vrijeme na tržištu su dostupni setovi za ELISA test različitih proizvođača koji za detekciju pojedinih alergena koriste različite vrste ELISA testa ("sendvič" ELISA, konkurentna ELISA). Antitijela koja se primjenjuju u testu proizvode se imunizacijom različitih životinja donora (zec, miš, koza, konj, ovca, kokoš) (Poms i sur., 2005). Korištenjem monoklonskih antitijela moguća je detekcija pojedinog epitopa antigena (alergena), dok je korištenjem poliklonskih antitijela moguća detekcija svih epitopa koje nosi alergen (Goodwin, 2004). Razlike u komercijalno dostupnim ELISA testovima su prisutne i u pogledu zahtjeva za pripremu samog uzorka i pH primijenjenog ekstrakcijskog pufera dostupnog u setu, čime se utječe na učinkovitost ekstrakcije proteina iz matriksa uzorka, koja je izuzetno bitna za daljnju analizu. Testovi pojedinih proizvođača se također razlikuju u otopinama standarda kikirikija koje se koriste za izradu baždarne krivulje, tako neki testovi kao standard koriste pročišćeni ekstrakt proteina kikirikija, a neki sadrže ukupni topljivi ekstrakt proteina kikirikija (Zeleny i Schimmel, 2010).

Osjetljivost, limit detekcije i kvantifikacije analitičkog sustava za detekciju alergena u *in vitro* uvjetima bi trebao biti dovoljno nizak kako bi omogućio detekciju alergena u uzorku koja potencijalno može izazvati alergijsku reakciju kod hipersenzibiliziranih osoba. Zbog toga bi granice detekcije komercijalno dostupnih ELISA testova za detekciju pojedinih alergena u hrani trebale biti od 1 do 100 mgkg<sup>-1</sup>. Trenutno su na tržištu dostupni ELISA testovi za određivanje alergena kikirikija s limitom detekcije za Ara h 1 od 0,1 mgkg<sup>-1</sup>, za Ara h 20,5 mgkg<sup>-1</sup> i za proteine kikirikija 2,5 mgkg<sup>-1</sup>. Limit kvantifikacije za Ara h 1 i Ara h 2 varira u rasponu od 1-20 mgkg<sup>-1</sup> i 1-15 mgkg<sup>-1</sup>, odnosno 3,3-90 mgkg<sup>-1</sup> za proteine kikirikija (Fielder i sur., 2010).



## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. MATERIJAL**

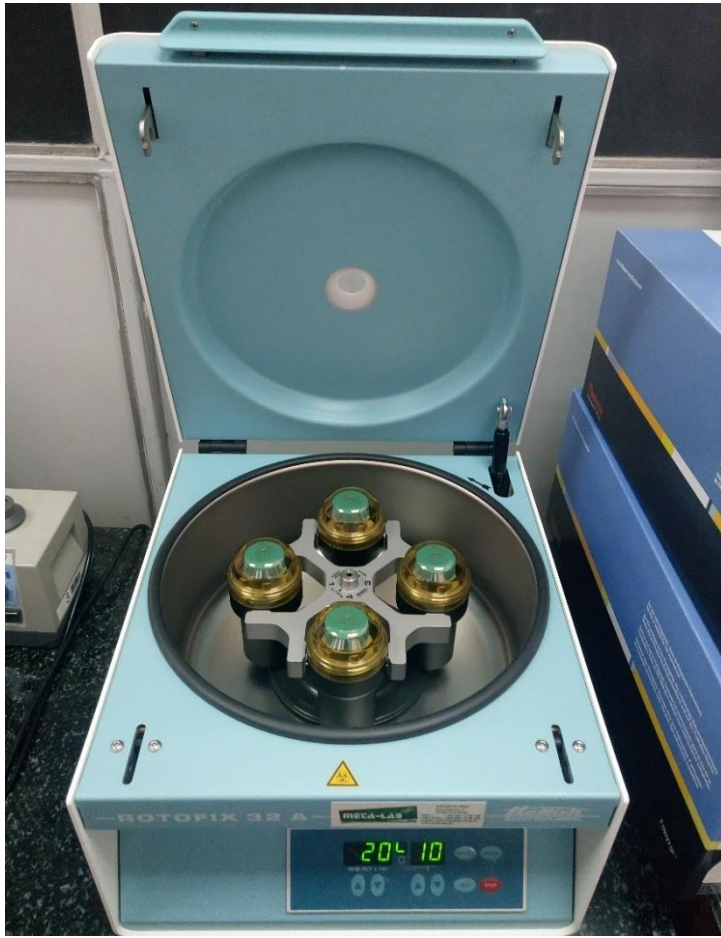
#### 3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja analizirana su četiri uzorka kakaovog praha različitih proizvođača te četiri uzorka instant kakaovih proizvoda različitih proizvođača. Navedeni uzorci su kupljeni na zagrebačkom tržištu te su svakom pridružene sljedeće oznake: od KP<sub>1</sub> do KP<sub>4</sub> za kakaov prah, a od IK<sub>1</sub> do IK<sub>4</sub> za instant kakaov proizvod.

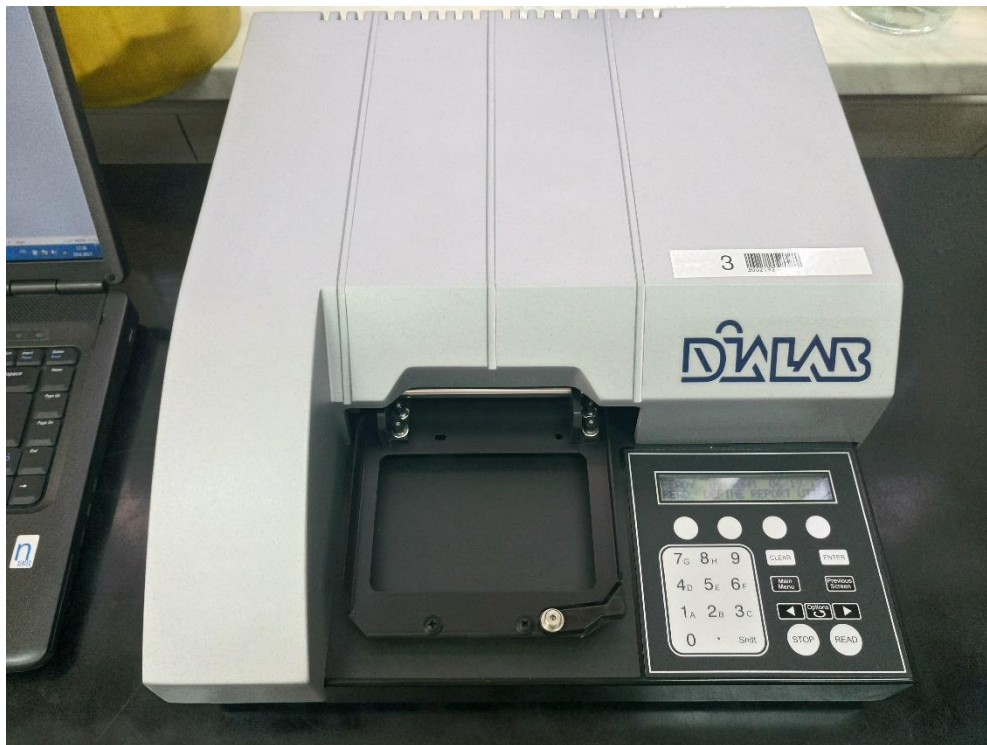
#### 3.1.2. Laboratorijska oprema i pribor

Prilikom provedbe analiza korišteni su sljedeći uređaji:

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



Slika 4. Centrifuga



Slika 5. ELISA čitač mikrotitarskih ploča

Laboratorijsko posuđe i pribor:

- boca štrcaljka
- automatska jednokanalna pipeta
- nastavci za pipetu
- Falcon epruvete
- špatula
- laboratorijska čaša od 100 mL
- laboratorijska čaša od 250 mL
- odmjerna tikvica od 10 mL
- odmjerna tikvica od 200 mL
- Erlenmeyerove tikvice
- stakleni lijevak
- stakleni štapić
- filter-papir
- set od 8 mikrožažica
- mikrotitarska ploča, AgraQuant, Romer Labs, Austrija
- staničevina.

### 3.1.3. Reagensi

- Ekstrakcijski pufer; AgraQuant, Peanut, Extraction & Sample Dilution Buffer, Romer Labs, Austrija
- Pufer za ispiranje; AgraQuant, Peanut, Wash Buffer, Romer Labs, Austrija
- Konjugat; AgraQuant-Peanut Enzyme, Romer Labs, Austrija
- "Stop" otopina; AgraQuant-Stop Solution, Romer Labs, Austrija
- filtrat otopine uzorka.

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Priprema otopina reagensa

Razrijeđena otopina ekstrakcijskog pufera i pufera za ispiranje pripremljena je u količini potrebnoj za navedeni broj uzoraka.

U odmjernu tikvicu je otpipetiran koncentrat ekstrakcijskog pufera te je razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:10 i uskladišten pri 4°C do upotrebe.

Otopina pufera za ispiranje je pripravljena razrjeđivanjem koncentrata pufera za ispiranje s destiliranom vodom u omjeru 1:10 te je uskladištena pri 4°C.

Pripremljene otopine su neposredno prije upotrebe izvađene iz hladnjaka te temperirane na sobnoj temperaturi prije korištenja.

### 3.2.2. Priprema otopina uzoraka

Izuzet je reprezentativni uzorak svakog pojedinog kakaovog praha i instant kakaovog proizvoda te je odvađeno 1 g uzorka na analitičkoj vagi u Falcon epruvetu. Uzorak je zatim razrijeđen dodatkom 20 mL ekstrakcijskog pufera te vorteksiran do potpune homogenizacije. Tako dobivena suspenzija uzorka je prenesena u vodenu kupelj i inkubirana pri 60 °C petnaest minuta, uz potresanje svake dvije minute kako bi se izbjeglo taloženje.

S ciljem dobivanja bistrog supernatanta, dobivena je suspenzija zatim podvrgnuta centrifugiranju (Slika 4) na 10 minuta pri 2 000 okretaja. Budući da nakon provedenog centrifugiranja nije dobiven potpuno bistri supernatant, on je dekantiran i dodatno profiltriran u Erlenmeyerovu tikvicu. Dobiveni bistri filtrat je prikupljen kako bi se u njemu odredio udio potencijalnih alergena kikirikija ELISA testom.

### 3.2.3. ELISA test

#### 3.2.3.1. Princip određivanja

AgraQuant test za kikiriki koji je korišten tijekom ovog istraživanja, prema principu određivanja se ubraja u "sendvič" ELISA test. Alergeni kikirikija se primjenom ekstrakcijskog pufera prethodno ekstrahiraju iz čvrstog uzorka, a zatim se otopina uzorka nanosi na mikrojažice na čijoj su površini imobilizirana primarna antitijela. Dolazi do vezanja alergena kikirikija iz uzorka i antitijela, a nakon koraka ispiranja kojim se uklanjaju nevezani antigeni se u mikrojažice dodaje konjugat. Konjugat je enzimom obilježeno sekundarno antitijelo koje reagira s imobiliziranim kompleksom alergena i primarnog antitijela. Nakon određenog vremena inkubacije slijedi ponovno ispiranje mikrojažica te dodatak kromogenog supstrata za enzim, prilikom čega dolazi do razvoja plave boje otopine. Nakon inkubacije se reakcija zaustavlja dodatkom "stop" otopine u mikrojažice, pri čemu dolazi do promjene boje otopine iz plave u žutu, a intenzitet nastalog obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri 450 nm. Budući da je izmjerena apsorbancija izravno proporcionalna koncentraciji alergena kikirikija u uzorku, na

temelju prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda kikirikija (Slika 7) određuje se udio potencijalnih alergena kikirikija u uzorku ( $\text{mgkg}^{-1}$ ).

### *3.2.3.2. Postupak određivanja*

Na mikrotitarsku ploču je postavljen set mikrojažica s imobiliziranim primarnim antitijelom. Korištenjem jednokanalne pipete s odgovarajućim nastavcima je u svaku mikrojažicu otpipetiran alikvot od 100  $\mu\text{L}$  filtrata pojedinog uzorka. Za svaki uzorak korišten je novi nastavak za pipetu te je sadržaj nastavka u potpunosti ispušten u pojedinu mikrojažicu.

Mikrotitarska ploča s mikrojažicama je zatim inkubirana 20 minuta pri sobnoj temperaturi bez pomicanja, kako bi se izbjegla kontaminacija iz jedne mikrojažice u drugu. Zatim je sadržaj mikrojažica ispražnjen izokretanjem mikrotitarske ploče s mikrojažicama za  $180^\circ$  na nekoliko slojeva staničevine postavljenih na ravnu površinu. Potom je u svaku mikrojažicu otpipetiran zadani volumen razrijeđenog pufera za ispiranje, nakon čega je sadržaj mikrojažica ispražnjen izokretanjem mikrotitarske ploče te lupkanjem na slojeve staničevine s ciljem uklanjanja zaostale tekućine iz mikrojažica. Postupak ispiranja je ponovljen te je svaka mikrojažica isprana ukupno pet puta korištenjem razrijeđenog pufera za ispiranje.

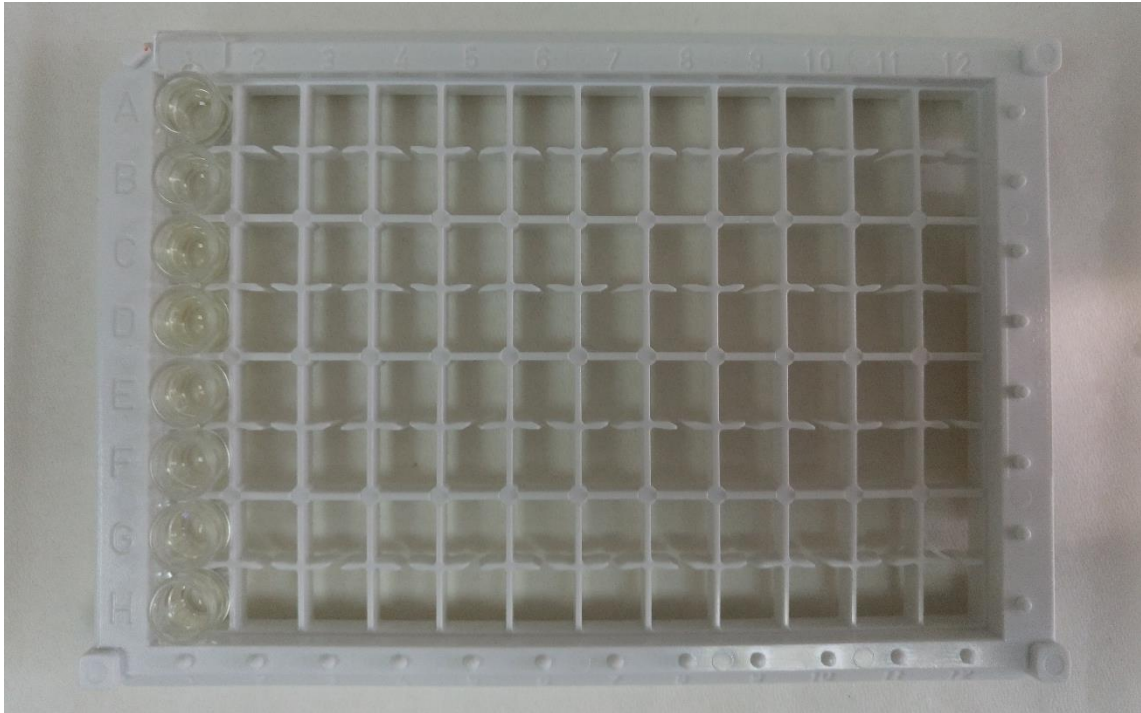
Nakon toga je u svaku mikrojažicu otpipetirano 100  $\mu\text{L}$  konjugata te inkubirano pri sobnoj temperaturi 20 minuta bez pomicanja stalka s mikrojažicama. Sadržaj mikrojažica je ispražnjen izokretanjem mikrotitarske ploče na površinu sa staničevinom, a mikrojažice su pet puta isprane s razrijeđenim puferom i dobro osušene lupkanjem o staničevinu kako bi se uklonili mjehurići zraka.

Zatim je u svaku jažicu otpipetirano 100  $\mu\text{L}$  supstrata te inkubirano 20 minuta u tami pri sobnoj temperaturi.

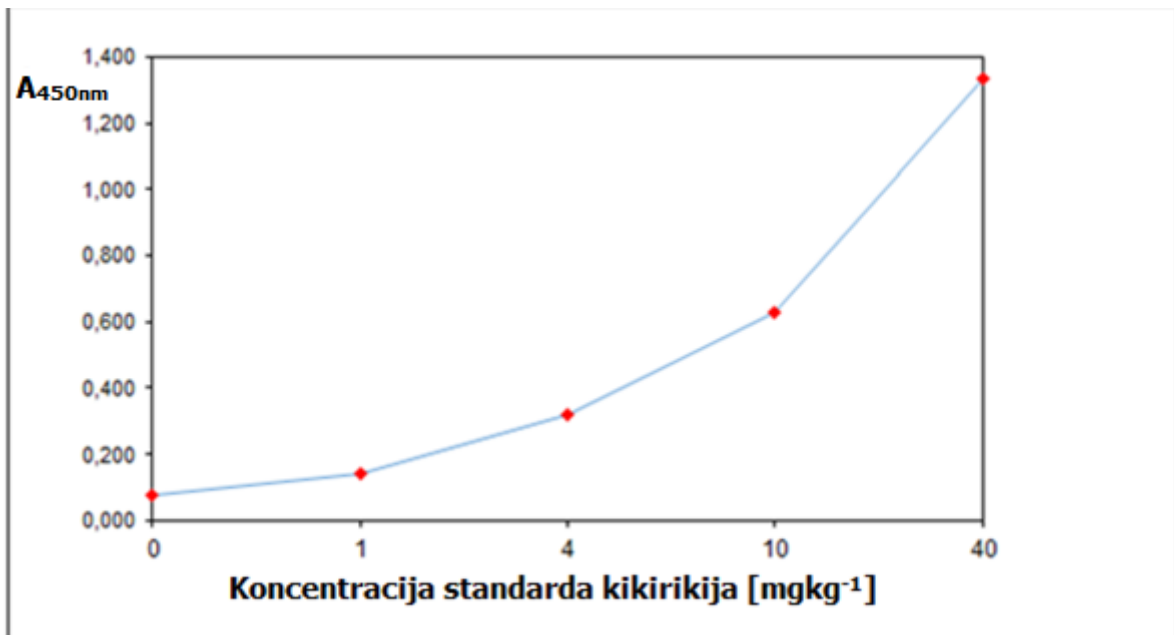
Nakon provedene inkubacije u tami, u svaku je jažicu otpipetirano 100  $\mu\text{L}$  "stop" otopine što je dovelo do promjene boje otopine u jažicama iz plave u žutu.

Kako bi se izmjerio intenzitet nastalog obojenja, mikrotitarska ploča s mikrojažicama (Slika 6) je pažljivo prenesena do čitača s filterom od 450 nm (Slika 5) te je pokrenut računalni program za očitavanje apsorbancije. Izmjerene vrijednosti apsorbancije za svaku pojedinu mikrojažicu su očitane i zabilježene.

Udio alergena kikirikija u svakom pojedinom uzorku je određen pomoću prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda kikirikija (Slika 7). Za izradu baždarnog dijagrama su bile korištene otopine standarda koncentracija 0, 1, 4, 10, 40 mgkg<sup>-1</sup>.



Slika 6. Mikrotitarska ploča s mikrojažicama



Slika 7. Baždarna krivulja standarda kikirikija

#### 3.2.4. Obrada podataka

Rezultati koji su dobiveni provođenjem mjerenja analizirani su pomoću programa Microsoft Excel 2016. Dobivenih rezultati su prikazani korištenjem standardnih metoda deskriptivne statistike i to kao srednja vrijednost ( $\bar{X}$ ), prosječna vrijednost i standardna devijacija (SD).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja su ELISA metodom određeni potencijalni alergeni kikirikija u četiri uzorka kakaovog praha te četiri uzorka instant kakaovih proizvoda različitih proizvođača, sa zagrebačkog tržišta. Uzorci kakaovog praha označeni su oznakama KP<sub>1</sub>, KP<sub>2</sub>, KP<sub>3</sub>, KP<sub>4</sub>, a uzorci instant kakaovih proizvoda oznakama IK<sub>1</sub>, IK<sub>2</sub>, IK<sub>3</sub>, IK<sub>4</sub>. Rezultati određivanja udjela potencijalnih alergena kikirikija (mgkg<sup>-1</sup>) su prikazani u tablicama 2-5.

Za potrebe kvantitativnog određivanja alergena kikirikija u ispitivanim uzorcima, u ovom istraživanju primijenjen je set za ELISA test AgraQuant Peanut Assay čiji je proizvođač Romer Labs iz Austrije. Limit detekcije ovog ELISA testa iznosi 0,10 mgkg<sup>-1</sup>, a detektirani udio alergena kikirikija je izražen u mgkg<sup>-1</sup>.

Usporedno s rezultatima ELISA testa su za svaki pojedini uzorak i tablično prikazani navodi s deklaracija koji su upućivali na eventualno prisustvo alergena.

Rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima kakaovog praha nalaze se u tablici 2.

Tablica 2. Udio (mgkg<sup>-1</sup>) alergena kikirikija u uzorcima (n=4) kakaovog praha

<b>Uzorak</b>	<b>Udio alergena kikirikija [mgkg<sup>-1</sup>]</b> (srednja vrijednost ± SD)
KP <sub>1</sub>	0,37 ± 0,000
KP <sub>2</sub>	<LOD*
KP <sub>3</sub>	0,47 ± 0,010
KP <sub>4</sub>	0,64 ± 0,010
<b>Prosječna vrijednost</b>	<b>0,37</b>
<b>Raspon</b>	<b>0,37-0,64</b>

\*limit detekcije (*eng. Limit Of Detection*)

U tri od ukupno četiri uzorka kakaovog praha detektirano je prisustvo alergena kikirikija. Udio alergena kikirikija u uzorku "KP<sub>2</sub>" nalazi se ispod limita detekcije (LOD) testa, odnosno manji je od 0,10 mgkg<sup>-1</sup>. Pri tome na deklaraciji ovog proizvoda nema navoda za moguće prisustvo alergena kikirikija.

Najniži udio alergena kikirikija detektiran je u uzorku "KP<sub>1</sub>" te iznosi 0,37 mgkg<sup>-1</sup>. Najviši detektirani udio alergena kikirikija je u uzorku "KP<sub>4</sub>" te iznosi 0,64 mgkg<sup>-1</sup>, što je donekle i



očekivano budući da je u okviru informacija o hrani proizvoda navedeno da može sadržavati tragove nekoliko različitih alergena, iako među njima nije izričito naveden kikiriki. Budući da kikiriki ne spada u skupinu orašastih plodova, već u skupinu leguminoza, prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 je svrstan u zasebnu skupinu alergena (Kikiriki i proizvodi od kikirikija). Sukladno tome navod o mogućoj prisutnosti orašastih plodova u tragovima se ne odnosi na kikiriki. Prosječna vrijednost detektiranog udjela alergena kikirikija u uzorcima kakaovog praha je 0,37 mgkg<sup>-1</sup>.

Tablica 3. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka kakaovog praha vezani uz prisustvo alergena

<b>Uzorak</b>	<b>Navod vezan uz prisustvo alergena</b>
KP <sub>1</sub>	(nema navoda)
KP <sub>2</sub>	(nema navoda)
KP <sub>3</sub>	(nema navoda)
KP <sub>4</sub>	"Može sadržavati gluten, jaja, mlijeko i orašaste plodove u tragovima"

U tablici 4 su prikazani rezultati određivanja alergena kikirikija u uzorcima instant kakaovih proizvoda.

Tablica 4. Udio (mgkg<sup>-1</sup>) alergena kikirikija u uzorcima (n=4) instant kakaovih proizvoda

<b>Uzorak</b>	<b>Udio alergena kikirikija [mgkg<sup>-1</sup>]</b> (srednja vrijednost ± SD)
IK <sub>1</sub>	0,26 ± 0,005
IK <sub>2</sub>	<LOD
IK <sub>3</sub>	0,15 ± 0,005
IK <sub>4</sub>	0,14 ± 0,000
<b>Prosječna vrijednost</b>	<b>0,14</b>
<b>Raspon</b>	<b>0,14-0,26</b>

Najniži udio alergena kikirikija detektiran je u uzorku "IK<sub>4</sub>" te iznosi 0,14 mgkg<sup>-1</sup>, a najviši je detektiran u uzorku "IK<sub>1</sub>" te iznosi 0,26 mgkg<sup>-1</sup>, pri čemu na deklaracijama oba proizvoda nisu postojali navodi o mogućem prisustvu alergena. U uzorku "IK<sub>2</sub>" se udio potencijalnih alergena kikirikija nalazio ispod limita detekcije testa. Prosječna vrijednost detektiranog udjela alergena kikirikija u uzorcima instant kakaovih proizvoda je 0,14 mgkg<sup>-1</sup>. U tri od četiri analizirana uzorka

su detektirani alergeni kikirikija iako niti na jednoj deklaraciji proizvoda nije navedeno da proizvod može sadržavati tragove kikirikija.

Tablica 5. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka instant kakaovih proizvoda vezani uz prisustvo alergena

<b>Uzorak</b>	<b>Navod vezan uz prisustvo alergena</b>
IK <sub>1</sub>	(nema navoda)
IK <sub>2</sub>	"Može sadržavati mlijeko"
IK <sub>3</sub>	"Može sadržavati mlijeko u tragovima"
IK <sub>4</sub>	(nema navoda)

Iz dobivenih rezultata prikazanih u tablicama 2. i 3. vidljivo je kako je u uzorcima kakaovog praha ELISA testom detektiran viši udio alergena kikirikija (prosječna vrijednost 0,37 mgkg<sup>-1</sup>) nego u uzorcima instant kakaovih proizvoda (prosječna vrijednost 0,14 mgkg<sup>-1</sup>). Mogući razlog tomu je taj što instant kakaovi proizvodi sadrže manju količinu kakaovih dijelova (sadržaj kacao praha prema deklaraciji analiziranih proizvoda se kretao u rasponu od 16 do 25 % kakaovog praha smanjene masti) od kakaovog praha pa je stoga i manja vjerojatnost da je došlo do značajnije kontaminacije potencijalnim alergenima kikirikija.

Posebno ugroženu skupinu s obzirom na alergiju na kikiriki predstavljaju djeca, a s obzirom na to da oni često konzumiraju proizvode koji sadrže kakaov prah (primjerice čokolada) i napitke s instant kakaovim proizvodima, osobito su izloženi skrivenim alergenima u ovim proizvodima koji u njima mogu biti prisutni uslijed križne kontaminacije.

Prema nekim istraživanjima minimalna doza alergena kikirikija koja može izazvati kratkotrajne simptome alergijske reakcije u hipersenzibiliziranih pojedinaca je 0,1 mg alergena kikirikija, dok teške sistemske reakcije uzrokuje ingestija 5 mg alergena kikirikija (Hourihane i sur., 1997).

Detektirani udio potencijalnih alergena kikirikija u analiziranim uzorcima instant kakaovih proizvoda kretao se u rasponu od 0,14-0,26 mgkg<sup>-1</sup>, a preporučena doza za serviranje pojedinačnog napitka je 13-15 g. Na temelju toga može se pretpostaviti da konzumacija instant kakaovih proizvoda teoretski ne bi trebala izazvati alergijsku reakciju kod hipersenzibiliziranih pojedinaca, no unatoč tome potrebno je biti na oprezu.

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata i provedene rasprave, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Imunoenzimska ELISA metoda korištena je za detekciju potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima kakaovog praha i instant kakaovih proizvoda. Od ukupno osam analiziranih uzoraka, u njih šest su ELISA testom detektirani potencijalni alergeni kikirikija.
2. Udio alergena kikirikija u analiziranim uzorcima kakaovog praha se kretao u rasponu od 0,37 do 0,64 mgkg<sup>-1</sup>, dok se u uzorcima instant kakaovih proizvoda kretao u rasponu od 0,14 do 0,26 mgkg<sup>-1</sup>. Promatrajući prosječne vrijednosti, u uzorcima kakaovog praha detektiran je viši udio (0,37 mgkg<sup>-1</sup>) alergena kikirikija u odnosu na uzorke instant kakaovih proizvoda (0,14 mgkg<sup>-1</sup>).
3. Najviši udio potencijalnih alergena kikirikija (0,64 mgkg<sup>-1</sup>) detektiran je u uzorku kakaovog praha "KP<sub>4</sub>", pri čemu je u okviru informacija o hrani proizvoda navedeno kako može sadržavati tragove orašastih plodova, međutim bez navoda o sadržaju kikirikija.

## 6. LITERATURA

- Anonymous 1 (2015) ELISA-Principle, Types and Applications, <<http://www.microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications>>. Pristupljeno 21. kolovoza 2017.
- Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D. (2010) Imunologija, 7. izd., Medicinska naklada. str. 32 – 34; 145 – 150; 210 – 216.
- Besler M., Kasel U., Wichmann G. (2002) Review: Determination of Hidden Allergens in Foods by Immunoassays. *Internet Symposium on Food Allergens* **4**: 1 – 18.
- Bošnjir J., Colić Barić I., Čurić D., Mandić M., Pollak L., Teklić T., Valek M. (2009) Alergije podrijetlom iz hrane. Hrvatska agencija za hranu (HAH). str. 15 – 16.
- Brandtzaeg P. (2011) The gut as communicator between environment and host: Immunological consequences. *European Journal of Pharmacology* **668**: 16 – 32.
- Burks A. W., Williams L. W., Helm R. M., Connaughton C., Cockrell G., O'Brien T. (1991b) Identification of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **88**: 172 – 179.
- Burks A. W., Williams L. W., Connaughton C., Cockrell G., O'Brien T. J., Helm R. M. (1992a) Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h 2, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **90**: 962 – 969.
- Burks W., Sampson H. A, Bannon G. A. (1998) Peanut allergens. *Allergy* **53**: 725 – 730.
- Butorac A., Marić M., Badanjak Sabolović M., Hruškar M., Rimac Brnčić S., Bačun Družina V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8**: 90 – 101.
- Cabanillas B., Pedrosa, M. M., Rodriguez J., Muzquiz M., Maleki S. J., Cuadrado C., Burbano C., Crespo J. F. (2011) Influence of enzymatic hydrolysis on the allergenicity of roasted peanut protein extract. *International archives of allergy and immunology* **157**: 41 – 50.
- Chen Y., Chen Q., He L., Shang B., Zhang L. (2012) Enzyme immunoassay and liquid chromatography-fluorescence detection for amikacin in raw milk. *Food Chemistry* **135**: 380 – 385.

- Chung S. Y., Butts C. L., Maleki S. J., Champagne E. (2003) Linking peanut allergenicity to the processes of maturation, curing and roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 4273 – 4277.
- Clarke M. C. A., Kilburn S. A., Hourihane J. O., Dean K. R., Warner J. O., Dean T. P (1998) Serological characteristics of peanut allergy. *Clinical and Experimental Allergy* **28**: 1251 – 1257.
- De Meulenauer B., De la Court M., Acke D., De Meyere T., Van de Keere A. (2005) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for peanut proteins using chicken immunoglobulins. *Food and Agricultural Immunology* **16**: 129 – 148.
- Engvall E., Perlman R. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8(9)**: 871 – 874.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2004) Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. *EFSA Journal* **32**: 76 – 83.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes *EFSA Journal* **12(11)**: 112 – 116.
- Fielder R., Higgs W., Barden K. (2010) Nutt allergen detection. U: Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists, Popping B., Diaz-Amigo C., Hoenicke K. J., ur., Wiley & Sons, Inc, str. 377 – 406.
- Fleischer D. M., Conover-Walker M. K., Christie L., Burks A. W., Wood R. A. (2004) Peanut allergy: recurrence and its management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **114**: 1195 – 1201.
- Flinterman A. E, van Hoffen E., den Hartog Jager C. F., Koppelman S., Pasmans S. G., Hoekstra M. O., Bruijnzeel-Koomen C. A., Knulst A. C., Knol E. F. (2007) Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h 2 and Ara h 6, which remains stable over time. *Clinical and Experimental Allergy* **37(8)**: 1221 – 1228.
- Goodwin P. R. (2004) Food Allergen Detection Methods: A Coordinated Approach. *Journal of AOAC International* **87(6)**: 1383 – 1390.
- Grundy J., Matthews S., Bateman B., Dean T., Hasan Arshad S. (2002) Rising prevalence of allergy to peanut in children: Data from 2 sequential cohorts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110**: 784 – 789.

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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**: 171 – 176.

Hill D. J., Hoskung C. S., Heine R. G. (1999) Clinical spectrum of food allergy in children in Australia and South-East Asia: identifications and targets for treatment. *Annals of Medicine* **31**: 272 – 281.

Hourihane J. O., Kilburn S. A., Nordlee J. A., Hefle S. L., Taylor S. L., Warner J. O. (1997) An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: a randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **100**: 596 – 600.

Hourihane J. O., Roberts S. A., Warner J. O. (1998) Resolution of peanut allergy: case-control study. *British Medical Journal* **316**: 1271 – 1274.

Hourihane J. O. (2011) Peanut allergy. *Pediatric Clinics of North America* **58**: 445 – 458.

Husain Z., Schwartz R. A. (2012) Peanut allergy: An increasingly common life-threatening disorder. *Journal of the American Academy of Dermatology* **66**: 136 – 143.

Johansson S. G. O., Bieber T., Dahl R., Friedmann P. S., Lanier B. Q., Lockey R. F., Motala C., Ortega Martell J. A., Platts-Mills T. A. E., Ring J., Thien F., Van Cauwenberge P., Williams H. C. (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**: 813 – 836.

Kolarić Kravar S. (2016) Noviteti u informiranju potrošača o hrani, <[http://www.stampar.hr/sites/default/files/Aktualno/Dogadjanja/nzj\\_predavanje\\_noviteti\\_u\\_informiranju\\_potrosaca\\_o\\_hrani.pdf](http://www.stampar.hr/sites/default/files/Aktualno/Dogadjanja/nzj_predavanje_noviteti_u_informiranju_potrosaca_o_hrani.pdf)> Pristupljeno 6. rujna 2017.

Lehrer S. B., Horner W. E., Reese G., Taylor S. (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36 (6)**: 553 – 564.

Lewis R. (1998) Life, 3. izdanje, The McGraw-Hill Companies.

Lexmaulová H., Gabrovská D., Rysová J., Stumr F., Netušilová K., Blazková M., Bulawová H., Brychta J., Subrtová Z., Pavelka J., Iametti S., Del Barco J. A., Quesada J. M., Pardo E.S., Resa I. P., Takkinen K., Laukkanen M. L., Píknová L., Langerholc T., Cencic A., Barsová

S., Cuhra P., Plicka J. (2013) ELISA kit for peanut protein determination: collaborative study. *Journal of AOAC International* **96(5)**: 1041 – 1047.

Martinis I. (2004) Nutritivna alergija. *Medix* **52**: 86 – 88.

Noimark L., Gardner J., Warner J. O. (2009) Parents attitudes when purchasing products for children with nut allergy: A UK perspective. *Pediatric Allergy and Immunology* **20**: 500 – 504.

Pevec B., Radulović Pevec M., Stipić Marković A., Batišta I. (2011) Signalni put visokoafinitetnog IgE-receptora u liječenju alergijskih bolesti. *Acta Medica Croatica* **65**: 425 – 434.

Poms R. E., Agazzi M. E., Bau A., Brohee M., Capelletti C., Nørgaard J., Anklam E. (2005) Inter-laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate. *Food Additives and Contaminants* **22(2)**: 104 – 112.

Pumphrey R. S. H. (2000) Lessons for management of anaphylaxis from a study of fatal reactions. *Clinical and Experimental Allergy* **30**: 1144 – 1150.

Sampson H. A. (1999) Food Allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **103**: 717 – 728.

Sampson H. A. (2004) Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**: 805 – 819.

Schroeder H., Cavacini L. (2010) Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**: 348 – 348.

Sicherer S. H. (2001) Clinical implications of cross-reactive food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108(6)**: 881 – 890.

Skolnick H. S., Conover-Walker M. K., Koerner C. B., Sampson H. A., Burks W., Wood R. A. (2001) The natural history of peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **107**: 367 – 374.

Spergel J. M., Beausoleil J. L, Pawlowski N. A. (2000) Resolution of childhood peanut allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **85(6)**: 473 – 476.

Stein C., Koch P., Gude T., Battaglia R., Poms R. E., Amado R., Anklam E. (2005) Umgang mit dem Problem der Erdnuss-Allergie in der Lebensmittelverarbeitung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **101**: 293 – 301.

Šadić S., Maltez Ćatić Z. (2013) Nutritivne alergije. Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku **2**: 28 – 35.

Štimac D., Krznarić T., Vranešić Bender D., Obrovac Glišić M. (2014) Dijetoterapija i klinička prehrana, Medicinska naklada, str. 201.

Taylor, S. L., Hefle, S. L., Bindslev-Jensen, C., Bock, S. A., Burks, A. W., Christie, L., i sur. (2002) Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: how much is too much? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **109**: 24 – 30.

Tizard I. R. (1996) *Veterinary Immunology: An Introduction*, 5. izd., W. B. Saunders Company. str. 216 – 237.

Uredba (EU) br. 1169/2011 Europskog parlamenta i Vijeća (2011) *Službeni list Europske unije* **L 304** (SL L 304/2011)

Van Hengel A. J. (2007) Declaration of allergens on the label of food products purchased on the European market. *Trends in Food Science & Technology* **18**: 96 – 100.

Vander Leek T. K., Liu A. H., Stefanski K., Blacker B., Bock S. A. (2000) The natural history of peanut allergy in young children and its association with serum peanut-specific IgE. *The Journal of Pediatrics* **137**: 749 – 755.

Vujošević M., Ljaljević J., Mičić J., Sučić I., Đukanović Lj., Šulović V. (2002) Klinička imunologija. SEZAM Medico. str. 509 – 648.

Wang Y., Fu T. J., Howard A., Kothary M. H., McHugh T. H., Zhang Y. (2013) Crystal Structure of Peanut (*Arachis hypogaea*) Allergen Ara h 5. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 1573 – 1578.

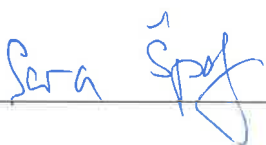
Wensing M., Penninks A. H., Hefle S. L., Koppelman S. J., Bruijnzeel-Koomen A., Knulst A. C. (2002) The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110**: 915 - 920.

Zeleny R., Schimmel H. (2010) Towards comparability of ELISA results for peanut proteins in food: A feasibility study. *Food Chemistry* **123**: 1343 – 1351.



## Izjava o izvornosti

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Sara Špić', is written over a horizontal line.

ime i prezime studenta