

Primjena ELISA metode u određivanju alergena kikirikija u uzorcima kolača koji sadrže kakaove dijelove

Hršak, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:754253>

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

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2017.

Lucija Hršak

721/N

**PRIMJENA ELISA METODE U
ODREĐIVANJU ALERGENA
KIKIRIKIJA U UZORCIMA
KOLAČA KOJI SADRŽE
KAKAOVE DIJELOVE**

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izv.prof.dr.sc. Kseniji Marković na vodstvu, pomoći i podršci pri izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem na ustupljenim materijalima i susretljivosti te pruženoj prilici da unutar ovog Zavoda izradim diplomski rad i upoznam osobe od kojih sam puno naučila i na čiju sam pomoć mogla računati.

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

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

PRIMJENA ELISA METODE U ODREĐIVANJU ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA KOLAČA KOJI SADRŽE KAKAOVE DIJELOVE

Lucija Hršak 721/N

Sažetak: Kikiriki se ubraja u najčešće nutritivne alergene koji kod alergičnih osoba može izazvati teške reakcije. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti udio potencijalnih alergena kikirikija u šesnaest uzoraka kolača koji sadrže kakaove dijelove pomoću ELISA testa te prikupiti stavove i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Alergeni kikirikija detektirani su u analiziranim uzorcima nepretpakiranih kolača iz slastičarnice, a njihov udio iznosio je prosječno $0,64 \text{ mgkg}^{-1}$. Prosječni udio alergena kikirikija u analiziranim uzorcima kolača iz objekta javne prehrane iznosio je $0,13 \text{ mgkg}^{-1}$, a u uzorcima iz trgovačkog lanca $0,62 \text{ mgkg}^{-1}$. Većina ispitanika (82,9 %) upoznata je s pojmom alergije, no njihova percepcija o tome u koju skupinu alergena se ubraja kikiriki često je pogrešna pa mnogi (57,9 %) smatraju kako se kikiriki ubraja u orašaste polodove. Od šesnaest ukupno analiziranih uzoraka nepretpakirane hrane, u jedanaest uzoraka bez navoda o prisutnosti kikirikija, ELISA metodom detektirani su alergeni kikirikija.

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

Rad sadrži: 53 stranice, 16 slika, 7 tablica, 95 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: izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 1. lipnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

DETERMINATION OF PEANUT ALLERGENS IN SAMPLES OF CAKES WITH COCOA PARTS BY ELISA METHOD

Lucija Hršak 721/N

Abstract: Peanut is one of the most common food allergens which in allergic people can cause life-threatening hypersensitivity reactions. In this study the commercial ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) test was used for determination of potential peanut allergens in sixteen samples of nonpacked cakes with cocoa parts and also the consumers opinion on peanut and peanut products as substances or products that cause allergies was examined. Peanut allergens were detected in analyzed samples of nonpacked cakes from pastry shop with average value of $0,64 \text{ mgkg}^{-1}$. The average value of peanut allergens in the analyzed cake samples from the public eating facility was $0,13 \text{ mgkg}^{-1}$ and from supermarket $0,62 \text{ mgkg}^{-1}$. Most of the respondents (82,9 %) are familiar with term 'allergy' but their perception about peanut is often wrong and many (57,9 %) consider that it belongs to nuts. In this study, among eleven samples of nonpacked cocoa cakes, which had no advisory label, peanut allergens were detected by ELISA method.

Keywords: allergens, peanut, ELISA, food information

Thesis contains: 53 pages, 16 figures, 7 tables, 95 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Ksenija Marković, Associate professor

Reviewers:

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

Thesis defended: 1st June 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ALERGIJE NA HRANU	2
2.1.1 Učestalost nutritivnih alergija.....	3
2.1.2. Najčešći nutritivni alergeni.....	4
2.2. KIKIRIKI	6
2.2.1. Općenito o kikirikiju	6
2.2.2. Alergijska reakcija na kikiriki	7
2.2.3. Alergeni kikirikija	9
2.2.4. Križne reakcije	10
2.3. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA KIKIRIKIJA.....	11
2.3.1. Imunokemijske metode	11
2.3.2. Molekularno-genetske metode	12
2.4. ELISA METODA.....	13
2.4.1. Vrste ELISA-testa	13
2.4.2. Primjena ELISA metode u određivanju alergena kikirikija	15
2.5. ZAKONSKA REGULATIVA	16
2.6. DIJETOTERAPIJA NUTRITIVNIH ALERGIJA	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. MATERIJAL.....	20
3.1.1. Uzorci	20
3.1.2. Ispitanici	20
3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor	20
3.1.4. Reagensi	22
3.2. METODE RADA	23
3.2.1. Priprema reakcijskih otopina.....	23
3.2.2. Priprema uzoraka / ekstrakcija	23
3.2.3. ELISA test.....	24
3.2.3.1. Princip određivanja.....	24
3.2.3.2. Postupak određivanja.....	24
3.2.4. Upitnik o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije	26
3.2.5. Obrada podataka.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. UDIO POTENCIJALNIH ALERGENA KIKIRIKIJA ODREĐENIH ELISA TESTOM U UZORCIMA KOLAČA KOJI SADRŽE KAKAOVE DIJELOVE	28

4.2. PERCEPCIJA POTROŠAČA O KIKIRIKIJU I PROIZVODIMA OD KIKIRIKIJA KAO TVARIMA ILI PROIZVODIMA KOJI UZROKUJU ALERGIJE	34
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45
7. PRILOZI.....	

1. UVOD

Reakcije preosjetljivosti na hranu (alergije) posljednjih su nekoliko godina u stalnom porastu, a jedna od najčešćih alergija je ona na proteine kikirikija. Usprkos sve većoj popularnosti hrane koja sadrži kikiriki, u osoba s alergijom na kikiriki čak i minorne količine mogu izazvati anafilaktički šok sa smrtnim posljedicama (Wensing i sur., 2002).

Najučinkovitiji način za sprečavanje pojave alergijskih reakcija je eliminacijska dijeta, odnosno striktno izbjegavanje namirnica koje sadrže alergen. Čitanje informacija o hrani na prehrambenim proizvodima jednostavna je i efikasna metoda u prevenciji alergičnih osoba od nenamjerne konzumacije kikirikija. No, unatoč velikim naporima proizvođača skriveni alergeni se mogu pojaviti u hrani putem križne kontaminacije zbog npr. korištenja zajedničke opreme tijekom proizvodnje. Iz tog se razloga sve više koriste različiti navodi o potencijalnoj prisutnosti alergena kikirikija, odnosno unutar iste skupine proizvoda postoje oni koji sadrže navode te oni bez navoda o potencijalnoj prisutnosti kikirikija (Hefle i sur., 2007).

Jedna od imunoenzimskih metoda koja se koristi za detekciju alergena je 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 šesnaest uzoraka kolača koji sadrže kakaove dijelove pomoću ELISA testa 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

Alergija ili preosjetljivost na hranu je reakcija organizma na neki od sastojaka hrane, smatrajući ga stranom tvari (antigenom) s posljedičnom promjenom imunološkog odgovora organizma. Preosjetljivost (hipersenzitivnost) može biti alergijska ili nealergijska, a alergijska se dijeli na onu posredovanu imunoglobulin E (IgE) protutijelima (npr. alergije na mlijeko, jaja i kikiriki) i one posredovane drugim imunim mehanizmima (npr. celijakija) (Johansson i sur., 2001). U kontaktu s alergenom tvari obrambeni sustav se poremeti i dolazi do reakcija između alergena (najčešće strane bjelančevine, tj. bjelančevine iz hrane) i antitijela, uz prekomjerno stvaranje IgE antitijela.

Tijekom života ljudsko biće preko hrane dolazi u dodir s tisućama raznovrsnih bjelančevina i svaka je potencijalni alergen. Nutritivni alergeni su po kemijskom sastavu proteini molekulske mase iznad 100.000 ili tvari vezane na proteine (hapteni). Hapteni su proteini životinjskog, rjeđe biljnog podrijetla. Prema tome, svaka namirnica može postati alergen bila sama proteinske naravi ili se vezala na haptenu. Osim toga proteini, polisaharidi ili lipidi vezani na haptene različite su snage. Jači su alergeni proteina i polisaharida nego lipida (Čvorišćec i sur., 2001). Epitop nutritivnog alergena određuju dvije značajke – linearni slijed aminokiselina i njegova prostorna konfiguracija. Prostorna konfiguracija značajna je za alergene mlijeka, soje, jaja i glutena, manje je stabilna i osjetljivija na termičku degradaciju, a kliničkom je očitovanju svojstveno da je alergija prolazna i najčešće nestaje nakon 3. do 6. godine života. Prevladavajući linearni epitopi u kikirikiju, ribi, školjakama i orašastim plodovima otporniji su i uzrokuju dugotrajne, često doživotne alergije (Sampson, 2004).

Rezultati istraživanja genetskih karakteristika alergijskih pojava u populaciji, obiteljskim studijama i u blizanaca ukazuju na poligeno nasljeđivanje. U osoba s genetskom predispozicijom (osobe s povećanom sintezom ukupnog i specifičnog IgE-antitijela), dolazi do veće učestalosti očitovanja karakterističnih dijelova genoma ili onih gena koji reguliraju sintezu tvari odgovornih za alergijske simptome. Prema tome, ako su oba roditelja alergičari, u 80% slučajeva će biti i djeca. Ako je samo jedan roditelj alergičar, vjerojatnost da će dijete biti alergično je 25% (Buttriss, 2001).

2.1.1 Učestalost nutritivnih alergija

Alergijske reakcije na hranu, kao i ostale alergijske bolesti, su zadnjih desetljeća u porastu osobito u razvijenim zemljama Zapada te zahvaćaju 1 - 10 % ukupne populacije (Štimac i sur., 2014).

Učestalost alergijskih reakcija na hranu povezuje se s načinom prehrane, pripremom namirnica, kulturološkim i socijalnim čimbenicima svojstvenim pojedinim zemljama i kulturama. Tako je senzibilizacija na rižu, soju, sezam, kikiriki itd. češća u zemljama gdje se navedene namirnice konzumiraju u većim količinama (Cochrane i sur., 2009). Također, brojne alergije na hranu se javljaju s paralelnim uvođenjem i širenjem „nove“ hrane u Europsku prehranu (na primjer kivi, prva alergijska reakcija na ovo voće opisana je 1981. godine, a danas je među deset najčešćih uzročnika alergija na hranu)

Nutritivne alergije najčešće su u djetinjstvu, no mogu se razviti u bilo kojoj životnoj dobi. U većini zemalja Zapada najčešće se javljaju na proteine kravljeg mlijeka, jaja, kikiriki, orašaste plodove, ribu, školjke, brašno i soju (Chapman i sur., 2006). U djece mlađe od 3 godine učestalost je od 6 do 8 % te se najviše javlja alergija na proteine kravljeg mlijeka. Ta alergija u većine alergične djece (oko 80 %) nestaje do pete godine života, za razliku od alergije na kikiriki na koji se u samo 20 % djece tijekom odrastanja razvije tolerancija (Lack, 2008).

Skripak i suradnici u svom radu navode kako se tolerancija na hranu razvija značajno sporije te da je u dobi od 4 godine samo 19% djece »preraslo« alergiju na proteine kravljeg mlijeka, 11% na proteine jaja, a tek je u dobi od 16 godina oko 80% djece postalo tolerantno i na proteine kravljeg mlijeka i jaja (Skripak i sur., 2007).

U djece se nakon alergije na proteine kravljeg mlijeka najčešće susreće alergija na jaja, kikiriki i pšenicu, a u odraslih na kikiriki, lješnjak, ribu i školjke (tablica 1).

Tablica 1. Prevalencija alergijskih reakcija na hranu u djece i odraslih te razvoj tolerancije (Sampson, 2004)

Hrana	Djeca (mlađa od 6 godina)	Odrasli	Razvoj tolerancije
Mlijeko	2,5%	0,3%	80%
Jaja	1,3%	0,2%	60-70%
Kikiriki	0,8%	0,6%	20%
Orašidi	0,2%	0,5%	Ne
Riba	0,1%	0,4%	Ne
Školjke	0,1%	2,0%	Ne
Ostalo	6%	3,7%	-

2.1.2. Najčešći nutritivni alergeni

Najčešći nutritivni alergeni odgovorni za približno 90 % svih alergijskih reakcija su kravlje mlijeko, jaja, soja, pšenica, kikiriki, orašasti plodovi te ribe i školjkaši (Hefle i sur., 1996). Alergija na kravlje mlijeko javlja se u oko 2,5 % dojenčadi i u djece do druge godine života te je to najčešća alergijska reakcija u djece te dobi. Smatra se da je tako zbog činjenice da mlijeko sadrži dvadeset proteinskih antigenskih komponenti, a svaka od njih pojedinačno ili više njih zajedno mogu izazvati alergijsku reakciju. Najčešći uzrok alergije na mlijeko u djece je β -laktoalbumin, rjeđe kazein (Martinis, 2004). Osobe s alergijom na mlijeko ne bi smjeli konzumirati ni svježi kravlji sir, jogurt, kiselo i slatko vrhnje, sladoled ili ostale mliječne proizvode. Lipoproteini mlijeka imaju vrlo mala alergenska svojstva zbog čega osobe alergične na mlijeko mogu bez posljedica jesti maslac (Buttriss, 2001).

Jaja, prije svega bjelanjak, česti su uzročnici alergije, i to češće u djece nego u odraslih. U jajetu se nalaze brojni proteini i glikoproteini koji mogu uzrokovati nastavak alergijske preosjetljivosti (ovalbumin, ovomukoid, ovotransferin i lizozim). Osobe alergične na jaja trebali bi eliminirati iz prehrane sva jela pripremljena s jajima (Sampson, 2001).

S nutritivnog aspekta, proizvodi soje bogati su proteinima i esencijalnim aminokiselinama zbog čega se često uvode u prehranu u najranijoj životnoj dobi, u obliku dječje hrane, osobito kod djece koja pokazuju netoleranciju ili alergiju na kravlje mlijeko. Prva zabilježena pojava

alergije na soju datira iz 1934. godine te je Organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization* - FAO) uključila soju i proizvode od soje na listu 8 najčešćih alergena koji potječu iz hrane. Do sada je identificirano najmanje 16 poznatih alergena iz soje. Za razliku od kikirikija, koji kao i soja pripada porodici leguminoza, alergija na soju vrlo rijetko izaziva ozbiljne reakcije koje mogu dovesti do anafilaktičkog šoka i smrti. Neke studije su pokazale da je potrebna 100 puta veća koncentracija sojinih proteina u odnosu na koncentraciju drugih alergena kako bi se izazvala ista alergijska reakcija organizma (Bošnjir i sur., 2009).

Kada govorimo o alergiji na žitarice, obično se spominje preosjetljivost na gluten pšenice. Gluten je frakcija proteina pšenice netopivih u vodi, glutelina i prolamina. Gluten, odnosno prolaminske frakcije glutena, uzrokuju celijakiju. Međutim, alergija na pšenicu i celijakija nisu jednako značajni, to su zapravo dva različita stanja. Kada osoba ima alergiju, imunološki sustav abnormalno reagira na proteine iz pšenice. Kada osoba oboljela od celijakije unese hranu koja sadrži gluten, on potiče imunološki sustav na reverzibilno uništavanje mukoze tankog crijeva. Alergije na hranu su stanja koja ljudi najčešće „prerastu“, odnosno s vremenom mogu razviti toleranciju na alergene iz hrane dok je celijakija doživotna neizlječiva bolest. Valja napomenuti da i ostale žitarice poput ječma, raži, zobi, krupnika, kamuta ili njihovih hibrida, a koji sadrže slične prolaminske frakcije, mogu izazvati alergijske reakcije. Ukoliko je dokazana alergija na pšenicu, savjetuje se izbjegavanje i navedenih žitarica. Kod nekih osoba može doći i do alergije na heljdu. Ne pojavljuje se često kao alergija na pšenicu, no problem predstavljaju njezini termostabilni alergeni koji mogu izazvati ozbiljne reakcije, slične onima koje izaziva kikiriki, poput astme ili anafilaktičkog šoka (Bošnjir i sur., 2009).

Alergijska reakcija na ribe i rakove najrasprostranjenija je u područjima kao što su Skandinavske zemlje, Japan i Španjolska, u kojima je ovakva prehrana najučestalija. Ukoliko je osoba alergična na jednu vrstu ribe, vjerojatnost da će biti alergična i na neku drugu vrstu je 50 %, dok u slučaju školjaka taj postotak raste na 75 %. Asmatski napadaji mogu se manifestirati kod nekih oboljelih čak i udisanjem mirisa ribe. Zaslužni alergeni za navedene reakcije su tropomiozin iz mišića ribe te protein parvalbumin (Bernhisel-Broadbent, 1992).

Orašasti plodovi su česti uzročnici alergijskih reakcija. Osjetljivost na više različitih orašastih plodova je česta, a često se povezuje i s alergijom na kikiriki. Osobe koje su osjetljive na pelud breze mogu reagirati i na alergene lješnjaka. Prženje može smanjiti aktivnost alergena lješnjaka, ali ga ne može skroz inaktivirati (Holzhauser i sur., 2002). Kod osjetljivih osoba nekoliko mikrograma može uzrokovati reakcije, ali točna granica nije utvrđena.

Među ovim namirnicama, kikiriki privlači veliku pozornost budući da se njegova konzumacija u alergičnih osoba povezuje s teškim reakcijama, uključujući i po život opasnu anafilaksiju. Nenamjerno izlaganje alergenima kikirikija, bilo kao dio sastojka hrane ili kao rezultat kontaminacije tijekom proizvodnje hrane, najveći je problem s kojim se susreću osobe alergične na kikiriki (Pomés i sur., 2003)

2.2. KIKIRIKI

2.2.1. Općenito o kikirikiju

Kikiriki (lat. *Arachis Hypogea*) je biljna vrsta iz porodice mahunarki (lat. *Fabaceae*). Izvorno potječe iz Južne Amerike iako se danas sve više uzgaja u drugim dijelovima svijeta zahvaljujući španjolskim istraživačima koji su donijeli kikiriki u Europu, odakle se njegova trgovina dalje proširila i u Afriku (Levetin i McMahan, 2008).

Zanimljivo je kako se žuti cvjetovi kikirikija razvijaju iznad zemlje, a zatim se zbog svoje težine svijaju prema zemlji i ulaze unutar nje gdje se razvijaju i sazrijevaju mahune kikirikija (slika 1). Svjetlosmeđa ljuska s okomitim linijama sadrži dva do tri zrna kikirikija, a svako ovalno zrno sastoji se od dvije polovice koje su prekrivene crveno-smeđom tankom kožicom.



Slika 1. Izvađena biljka kikirikija pokazuje razvoj ploda mahuna ispod zemlje (preuzeto iz Levetin i McMahan, 2008)

Komponente cjelovitog kikirikija su ulje (40-50 %) koje je ujedno i njegov glavni proizvod sa sadržajem od oko 80 % nezasićenih masnih kiselina, proteini (25-30 %) i ugljikohidrati (24 %).

Sadržaj oleinske i palmitinske kiseline čine ga stabilnim u prehrambenim proizvodima te zadržavanju kvalitete tijekom kuhanja.

Ispitivanja na pokusnim životinjama upućivala su na aterogenost kikirikija, osobito se upozoravalo na štetnost kikirikijeva ulja zbog sastava masnih kiselina i nepovoljnih učinaka na serumske lipoproteine. Kasnije se, međutim, vidjelo da je u tim ispitivanjima prehrana pokusnih životinja bila izrazito bogata kolesterolom. Kada je to izmijenjeno, dobiveni su suprotni rezultati, te su daljnja ispitivanja na ljudima pokazala korisne učinke konzumiranja kikirikija. Stoga se danas smatra da on također, kao i orašasto voće, smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti (Kris-Etherton i sur., 2008).

Oko 2/3 svjetske proizvodnje koristi se za proizvodnju ulja i maslaca od kikirikija, a ostalo za proizvodnju grickalica i slatkiša s kikirikijem. Kikiriki maslac je jedinstveni američki proizvod, čije porijeklo seže u 1890-te godine kada ga je liječnik St. Louis osmislio kao hranjivu i lako probavljivu hranu za bolesnike koji su imali poteškoća sa žvakanjem (Levetin i McMahon, 2008). Sjedinjene Američke Države treće su po proizvodnji kikirikija u svijetu, iza Kine i Indije (Sampson, 2002).

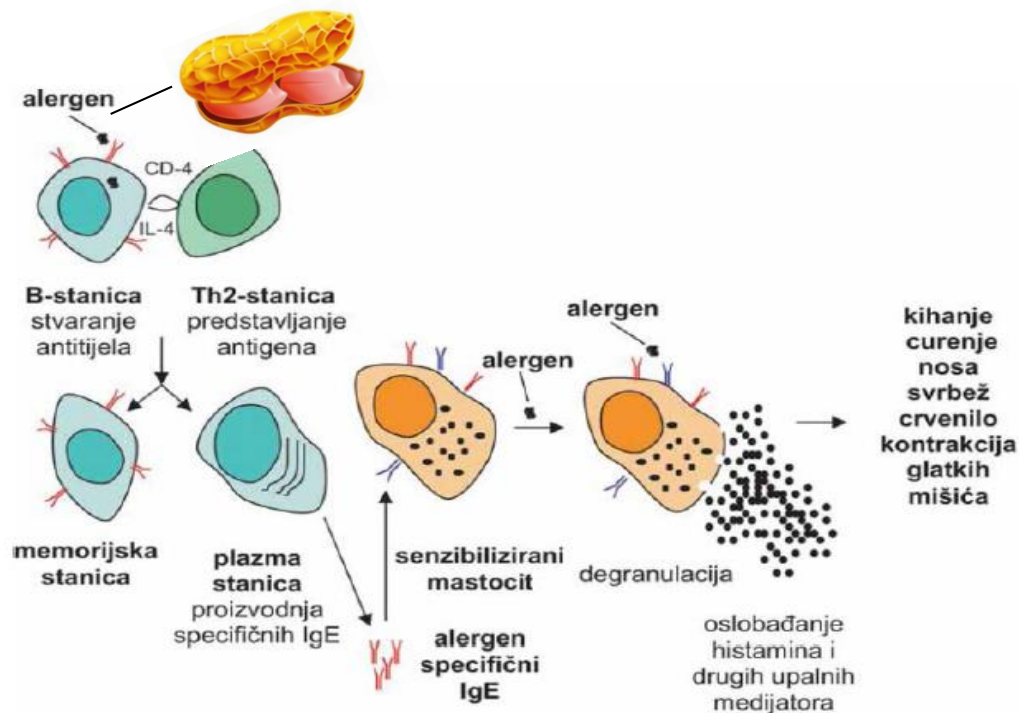
2.2.2. Alergijska reakcija na kikiriki

Unatoč njegovoj velikoj popularnosti, dva se glavna problema vežu uz sigurnost konzumacije kikirikija. Prvi problem je kontaminacija aflatoksinom, proizvod plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*, koji je kancerogen te se povezuje sa mentalnom zaostalošću (Yu i sur., 2003). Srećom, pravilno skladištenje i rukovanje mogu potpuno ukloniti rizik od kontaminacije aflatoksinom (Boutrif, 1995).

Drugi problem veže se uz alergenost kikirikija. Do manifestacije alergijske reakcije dolazi u nekoliko koraka: prezentacija antigena, proizvodnja IgE antitijela, aktivacija mastocita, otpuštanje mediatora upale te naposljetku ispoljavanje simptoma (slika 2). Kada imunološki sustav, odnosno B stanice imunološkog sustava, prvi put stupe u kontakt s alergenom one stvaraju antitijela (najčešće imunoglobuline E), koja se vežu na mastocite i na taj način stvaraju stanice osjetljive na dotični alergen (Lehrer i sur., 1996).

Prilikom slijedećeg izlaganja alergen se veže za IgE molekule prisutne na mastocitima i time se pokreće signalna kaskada koja vodi aktivaciji mastocita. Aktivirani mastociti luče sadržaj svojih granula (histamin), citokine i lipidne medijatore, molekule koji su direktni uzročnici kliničkih manifestacija alergijskih reakcija. Najzaslužniji za alergijske reakcije je histamin koji nastaje dekarboksilacijom histidina, a može uzrokovati različite upalne procese, svrbež te

kontrakcije glatkog mišićja krvnih žila, probavnog i dišnog sustava. Od značajnijih medijatora upala navode se još i prostaglandini, leukotrieni te citokini (Lehrer i sur., 1996).



Slika 2. Mehanizam alergijske reakcije (Randall i Neil, 2009)

Kikiriki može izazvati alergijsku reakciju neposredno nakon izloženosti uzrokujući različite simptome (Sampson, 2002). U istraživanju sa 662 osobe s alergijom na kikiriki, u 76 % pojedinaca alergijska reakcija je nastupila nakon 5 minuta (Hourihane i sur., 1997). Alergijski simptomi mogu se pojaviti po cijelom tijelu; od manjih poput svrbeža ili bolova u abdomenu do onih mnogo opasnijih koji uključuju stezanje dišnih puteva, sniženje krvnog tlaka (hipotenzija), gubitak svijesti, anafilaksiju pa čak i smrt (Benjamini i Leskowitz, 1991). Vrlo mala količina proteina kikirikija (0,1-1000 mg) može izazvati alergijsku reakciju (Wensing i sur., 2002). Jedno zrno kikirikija teži otprilike 800 mg (Sicherer, 2002) i sadrži oko 200 mg proteina pa alergijsku reakciju može izazvati količina koja odgovara masi manjoj od jednog zrna (Goldman, 1998). Pored slučajne ingestije, alergijska reakcija na kikiriki može biti izazvana dodiranjem i ljubljenjem. Oticanje usana i jezika zabilježeno je kod kartaša gdje su karte bile kontaminirane kikirikijem od strane igrača koji su ga konzumirali (Lepp i sur., 2002). Literatura navodi kako je 2 od 1139 ispitivanih alergičnih osoba imalo simptome nakon ljubljenja (Eriksson i sur., 2003). Procjenjuje se kako anafilaksija izazvana kikirikijem pogađa

oko 1,5 milijuna ljudi te uzrokuje 50-100 smrti godišnje u Sjedinjenim Američkim Državama (Leung i sur., 2003).

Alergija na kikiriki manifestira se u vrlo ranoj životnoj dobi. Podaci iz volonterskog registra pokazuju kako je 89 % pojedinaca s alergijom na kikiriki mlađe od 18 godina dok se prva alergijska reakcija na kikiriki javlja u dobi od 14 mjeseci (Sicherer i sur., 2001).

Mogući načini porijekla alergije na kikiriki u ranoj životnoj dobi su izloženost 'in utero' te preko majčinog mlijeka. Većina pojedinaca alergičnih na kikiriki reagira prilikom prve izloženosti ka istome jer se senzibilizacija moguće dogodila za vrijeme izloženosti 'in utero'. Zbog toga se preporuča izbjegavanje kikirikija tijekom trudnoće i za vrijeme dojenja (Hourihane i sur., 1997). Novija istraživanja ukazuju da nema dovoljno dokaza za potporu ovakvih ograničenja tijekom trudnoće i dojenja (Bunyavanich i sur., 2014). Zapravo, sve je više dokaza kako rana izloženost nutritivnim alergenima, a ne njihova odgoda ili izbjegavanje, može biti korisna u razvoju tolerancije prema alergenima i prevenciji nutritivnih alergija u dječjoj dobi (Young, 2015).

Američka akademija za pedijatriju (engl. *American Academy of Pediatrics*) ne preporuča uvođenje kikirikija u prehranu djece do treće godine života (Zeiger, 2003).

Niža incidencija alergije na kikiriki zabilježena je u zemljama poput Danske i Norveške gdje je kikiriki maslac rijetko zastupljen u prehrani (Sampson, 2002). Na razvoj alergije na kikiriki također utječe i način na koji je on pripremljen (Beyer i sur., 2001). Alergija na kikiriki zastupljenija je u razvijenijim zemljama gdje ljudi obično konzumiraju prženi kikiriki (Hourihane, 2002). Uspoređujući Kinu i SAD, gdje ljudi konzumiraju slične količine kikirikija po glavi stanovnika, vidi se razlika u prevalenciji nutritivne alergije na kikiriki. U Kini je alergija manje zastupljena zbog toga jer se kikiriki najčešće konzumira kuhan ili pržen u ulju, dok Amerikanci jedu isključivo suho prženi kikiriki u čijem procesu pripremanja temperatura od 180°C stupnjeva pridonosi alergenosti proteina (Mondoulet i sur., 2005).

2.2.3. Alergeni kikirikija

Plod kikirikija sadrži u prosjeku 29 % proteina (Freeman i sur., 1954) od čega 12 % do 16 % od ukupnih proteina čini glavni alergen kikirikija Ara h 1 (vicilin-sličan protein), molekulske mase 63-64 kD. Drugi glavni alergen Ara h 2 (koglutin-sličan protein) čija molekulska masa iznosi približno 17 kD čini 5,9 % do 9,3 % ukupnog sadržaja proteina kikirikija (Koppelman i sur., 2001). Oba navedena alergena odlikuju se visokom stabilnošću (Mondoulet i sur., 2005) i više od 95 % osoba alergičnih na kikiriki posjeduje antitijela (IgE) upravo za Ara h 1 i Ara h 2 (Scurlock i Burks, 2004).

Ostali alergeni kikirikija su Ara h 3 i 4 (proteini glicinina) (Koppelman i sur., 2003), Ara h 5 (profilin), Ara h 6 i 7 (Scurlock i Burks, 2004) i Ara h 8 (Mittag i sur., 2004).

Istraživanje provedeno 1999. godine pokazalo je kako prženje nema značajnog utjecaja na smanjenje alergnosti Ara h 1 (Koppelman i sur., 1999) te je također otporan na razgradnju proteolitičkim enzimima za vrijeme probave hrane (Malecki i sur., 2000).

Studija koja je pratila utjecaj temperature na alergnost Ara h 2 ukazuje kako je IgE imunoreaktivnost pročišćenog Ara h 2 iz prženog kikirikija bila veća od one iz sirovog i kuhanog kikirikija (Mondoulet i sur., 2005).

2.2.4. Križne reakcije

Križna reakcija nastaje kada dva ili više alergena imaju iste ili vrlo slične epitope, što dovodi do vezanja istih IgE protutijela. Zbog toga bolesnici koji su senzibilizirani na jedan alergen, mogu reagirati i na drugi, a da prije nisu s njime došli u kontakt. Senzibilizirani organizam posjeduje specifična IgE protutijela koja se mogu vezati s više različitih alergena prepoznajući slične trodimenzionalne strukture njihovih epitopa (Brandtzaeg, 2011).

Procjenjuje se kako 20 do 50 % pojedinaca alergičnih na kikiriki ima alergiju i na orašaste plodove (Sicherer i sur., 2003). No, još uvijek je sporno da li je križna reakcija između kikirikija i orašastih plodova rezultat taksonomske bliskosti ili sličnosti u homologiji IgE-vezujućih epitopa (Malecki i sur., 2011). Strukturna sličnost između Ara h 3 kikirikija i alergena orašastih plodova poput Jug r 4 (orah), Cor a 9 (lješnjak) te Ana o 2 (indijski oraščić) sugerira na izbjegavanje orašastih plodova u osoba s alergijom na kikiriki (Ball i sur., 2011).

Osobe s alergijom na pelud breze mogu razviti križnu reakciju na kikiriki zbog sličnosti strukture alergena Ara h 5 (kikiriki) alergenu Bet v 2 (breza), no po ranijim saznanjima strukturna sličnost je bila usko povezana s Hev b 8 što znači da IgE epitope treba tumačiti s oprezom (Vujošević i sur., 2002). U istraživanju Geroldinger-Simica i suradnika (2011) uključeno je 225 osoba s alergijom na pelud breze. Testiranjem seruma tih pacijenata ELISA metodom radi utvrđivanja reakcije IgE na rBet v 1, rezultati su pokazali 205 pozitivnih pacijenata. Rezultati imunoblota su pokazali 210, a ImmunoCAP 147 pozitivnih seruma. Pacijenti su potom ispunili upitnik u kojem je 165 od 225 osoba izjavilo da je imalo reakciju na najmanje jednu od 16 ponuđenih namirnica u upitniku. Od tih namirnica jabuka je izazivala simptome kod 80 % pacijenata, lješnjak kod 59,4 %, a potom redom breskva, kivi i orah. Najčešći simptomi bili su svrbež u usnoj šupljini, a potom rinitis, konjuktivitis, naoticanje usana, stezanje grla i dr. Osobe koje su imale alergiju na određene namirnice imale su i višu razinu

IgE specifičnih antitijela na Bet v 1 alergen, za razliku od onih pacijenata koji nisu imali alergiju na te određene namirnice.

2.3. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA KIKIRIKIJA

Uslijed široke rasprostranjenosti hrane koja sadrži kikiriki, nepravilnog označavanja te njegove prisutnosti u sirovinama i proizvodnim linijama, tragovi kikirikija mogu se pojaviti u hrani koja ga inače ne bi trebala sadržavati. Ova činjenica predstavlja potencijalnu opasnost za osobe s alergijom na kikiriki (Whitaker i sur., 2005). Stoga su pouzdane metode za određivanje alergena kikirikija nužne kako bi se osigurala usklađenost s informacijama o hrani te poboljšala zaštita potrošača, osobito onih alergičnih na kikiriki.

Nažalost, alergeni su često prisutni u tragovima ili su zamaskirani miljejem hrane pa je njihovu prisutnost teško odrediti (Poms i sur., 2004). Opća suglasnost nalaže kako granica detekcije alergena u različitoj hrani mora biti od 1 do 100 mgkg⁻¹ (Koppelman i sur., 1996). Osim osjetljivosti, specifičnost je još jedan uvjet za razvijanje testova pomoću kojih se otkrivaju alergeni u hrani (Krška i sur., 2004).

Razni faktori mogu smanjiti osjetljivost testova u određivanju i kvantifikaciji alergena kikirikija u prehrambenim proizvodima. Jedan od njih je oporavak kikirikija nakon podvrgnuća visoko procesiranim postupcima. Njegov manji oporavak može rezultirati smanjenom osjetljivošću testa pa tako dati i lažno negativne rezultate (Poms i sur., 2002). Drugi faktor su moguće interakcije različitih spojeva u hrani. Literatura pokazuje kako određivanje kikirikija u čokoladi može biti problematično, a razlog tome su tanini iz tamne čokolade koji interferiraju s alergenima kikirikija pa je njihova detekcija otežana. To je potvrđeno dodatkom riblje želatine pri ekstrakciji koja je, vežući tanine, omogućila otkrivanje tragova kikirikija (Hurst i sur., 2002). Nadalje, uvjeti obrade poput temperature i vremena u proizvodnji ulja ili prženog kikirikija također utječu na osjetljivost metode (Poms i sur., 2002).

2.3.1. Imunokemijske metode

Nekoliko vrsta metoda primjenjuje se u detekciji tragova proteina i/ili alergena kikirikija. Te metode usmjerene su ili na proteine kikirikija ili na fragmente koji kodiraju za alergene kikirikija (Koppelman i sur., 1996).

Prvom skupinom metoda mogu se odrediti ukupni proteini kikirikija, ali i njegovi specifični alergeni. Neke od imunoanalitičkih metoda su: RAST (engl. *Radio-Allergosorbent Test*), RIE (engl. *Rocket Immuno-electrophoresis*), EAST (engl. *Enzyme Allergosorbent Test*), dot-

immunoblotting metoda, ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), RIA (engl. *Radio-Immunoassay*). Immunoblotting metoda i RIE daju samo kvalitativne ili semi-kvantitativne rezultate, dok su ELISA, RAST i RIA kvantitativne metode (Poms i sur., 2004). Imunoanalitičke metode uglavnom se biraju 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). Temelje se na reakciji antitijelo-antigen, a ključni korak je odabir odgovarajućeg izvora antitijela. Prvi izvor antitijela bio je serumski IgE senzibiliziranih pacijenata (Keating i sur., 1990), no ne primjenjuju se u komercijalnim testovima iz etičkih razloga i visokog stupnja varijacije uslijed individualnosti pacijenata. Najčešće se zamjenjuju poliklonskim antitijelima (IgG) zeca, koza ili ovaca i monoklonskim antitijelima miševa (Krška i sur., 2004).

Metoda kojom je prvi puta imunološki dokazana prisutnost proteina kikirikija je RIE metoda (Barnett i Howden, 1984), no kako ona zahtijeva dugotrajnu pripremu gela te imuno-bojanje, nije široko primjenjiva u otkrivanju alergena (Besler i sur., 2002). Ova metoda imala je u početku limit detekcije 30 mgkg^{-1} , zatim se razvila do 10 mgkg^{-1} .

RAST (engl. *Radio-Allergosorbent Test*) i EAST (engl. *Enzyme-Allergosorbent Test*) metode određuju razinu specifičnih IgE antitijela. Prva primjena RAST metode datira iz 1983. godine gdje se utvrđivala kontaminacija kikirikijem u hrani koja ga po svojoj prirodi ne sadrži. Istraživači su pronašli tragove kikiriki maslaca ($3000\text{--}33000 \text{ ppm}$) u šest od osam uzoraka suncokretovog maslaca, a razlog je vjerojatno bio u korištenju iste proizvodne linije (Yunginger i sur., 1983).

2.3.2. Molekularno-genetske metode

Molekularno-genetske metode temelje se na umnažanju molekule DNK-a gdje se za njezinu analizu uglavnom koriste lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) i njene modifikacije. Iako su ove metode ograničene zbog fragmentacije DNK i PCR inhibitora iz hrane, imaju vrlo nisku granicu detekcije (Holzhauser i sur., 2002). Još jedna prednost je u tome što se DNK sekvenca ne mijenja s obzirom na geografske i sezonske značajke koje mogu utjecati na promjenu sastava proteina (Poms i sur., 2004). Štoviše, ciljana DNK može se uspješno ekstrahirati i pod uvjetima visoke denaturacije koja manje utječe na nju u odnosu na proteine. Međutim, molekularno-genetske metode usmjerene su ka određivanju gena alergena, a ne na alergene pa se rezultati ne mogu vezati za stvarnu alergijsku izloženost. Drugi nedostatak je što su troškovi materijala i opreme veći u odnosu na imunokemijske metode, a složenost procedure čini ih teškim za korištenje unutar proizvodnih objekata (Wen i sur., 2007).

2.4. ELISA METODA

Kako bi se izbjegla nenamjerna kontaminacija alergenima u hrani, primjena brzih, jednostavnih i isplativih metoda nužna je kako za proizvođače tako i za potrošače, osobito one s određenim nutritivnim alergijama. Imunokemijske metode odlikuju se tim svojstvima, a najraširenija među njima je ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Koppelman i Hefle, 2006).

Ovaj imunoenzimski test sastoji se od dvije reakcije. Imunološku reakciju predstavlja vezanje antitijela i antigena iz uzorka i ona je nevidljiva, dok je reakcija enzima i supstrata kemijska reakcija, pri čemu se bezbojni supstrat oboji (Engvall i Perlman, 1971). Reakcija se očitava prema promjeni boje supstrata što ga enzim razgrađuje, a mjerenje apsorbancije provodi se spektrofotometrijski.

ELISA tehnika se koristi u obliku raznih komercijalnih ELISA set kitova. Set kitovi za određivanje alergena u osnovi sadrže: čvrstu površinu (mikrotitracijska ploča obično s 96 jažica, 12 x 8), antigen ili antitijelo vezano za čvrstu površinu (dno mikrotitracijske ploče obloženo protutijelima/antigenom), standarde, tj. uzorke pozitivne i negativne kontrole, enzimijski konjugat, supstrat/kromogen, stop-otopinu za zaustavljanje enzimske reakcije te pufer za ekstrakciju i ispiranje (Koppelman i Hefle, 2006).

2.4.1. Vrste ELISA-testa

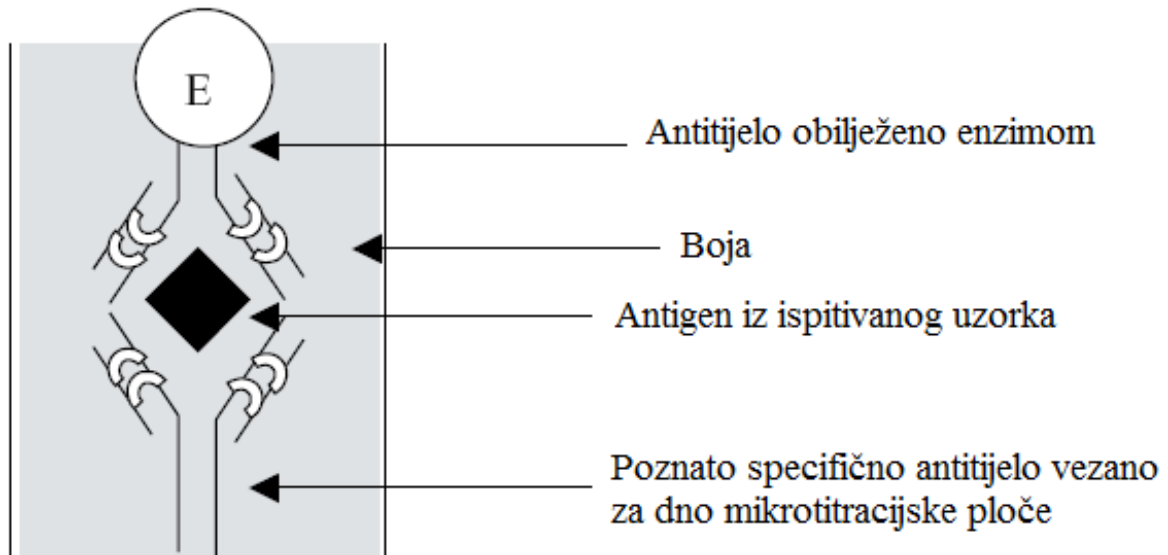
U prehrambenoj industriji ELISA test se najčešće koristi pri određivanju pesticida, mikotoksina, antibiotika i alergena u hrani kao što je mlijeko, jaja, lješnjak i kikiriki (Koppelman i Hefle, 2006). Budući da se ova metoda odlikuje visokom osjetljivošću i selektivnošću, njome je moguće odrediti vrlo nisku koncentraciju analita od primjerice nekoliko ng po kilogramu ispitivanog uzorka.

Po načinu izvođenja postoji nekoliko vrsta ELISA tehnika: indirektna, "sendvič", konkurentna te nova višestruka prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča, a u određivanju alergena najčešće se koriste "sendvič" i konkurentna ELISA tehnike.

1) Direktna ili „sendvič“ ELISA tehnika

Kod ovog oblika ELISA tehnike, poznato specifično antitijelo vezano je za dno mikrotitracijske ploče. Za njega se vezuje antigen iz materijala koji se ispituje, ukoliko je prisutan (slika 3). Poslije ispiranja dodaje se konjugat kojega čine antitijela, specifična za ispitivani antigen, vezana enzimom. Ova antitijela se vežu za antigen, ukoliko se u prethodnoj fazi vezao za ploču i nije ispran. Enzim tada stupa u reakciju sa supstratom i pojavljuje se obojenje koje ukazuje na

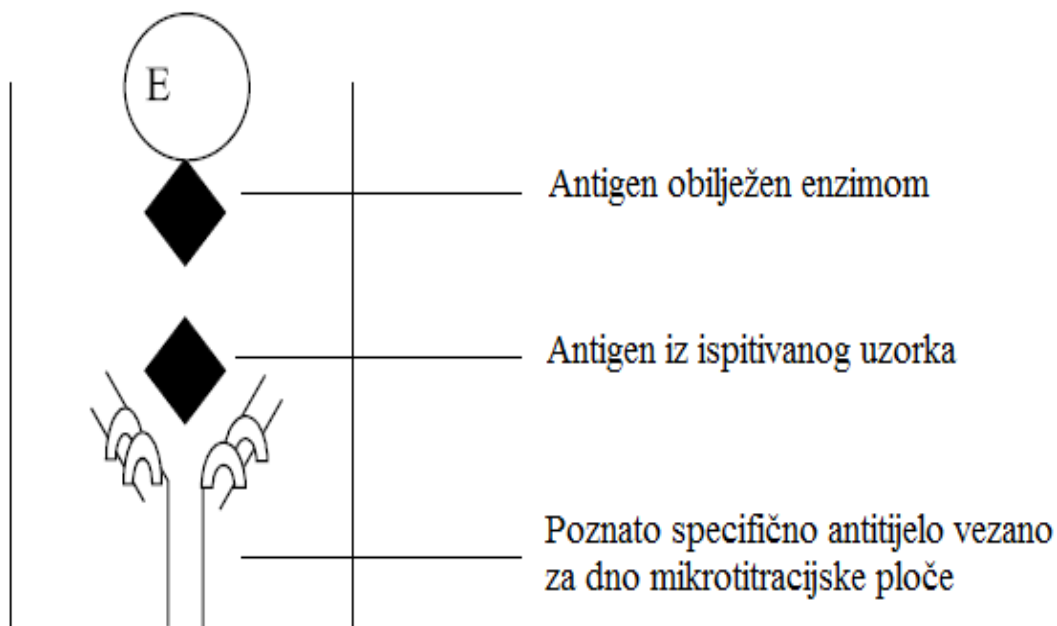
prisutnost kompleksa antitijelo-antigen-antitijelo. U većini slučajeva kao kromogen se koristi tetrametilbenzidin pri čemu dolazi do razvitka plave boje. Potom se dodaje STOP otopina (npr. sumporna kiselina) kojom nastaje žuti produkt. Obojenje se mjeri spektrofotometrijski pri 450 nm, pomoću mikro-čitača, a intenzitet boje je proporcionalan količini prisutnog antigena u materijalu koji se ispituje (Immer i Lacorn, 2015).



Slika 3. Shematski prikaz "sendvič" ELISA metode (Đurišić i sur., 2003)

2) Kompetitivna ili blokirajuća ELISA tehnika

Kao i kod „sendvič“ ELISA-e poznato specifično antitijelo vezano je na dno mikrotitracijske ploče (slika 4). U jažice ploče se dodaje materijal koji se ispituje, a zatim konjugat kojeg čini poznati antigen spojen s enzimom. Dodavanjem određene količine primarnog antitijela i slobodnog antigena (uzorka) provodi se kompeticija između antigena i antigena s enzimom za specifično antitijelo vezano u mikrotitracijsku ploču. Prednost ima antigen iz materijala koji se ispituje, ukoliko ga ima, budući da je prvi dodan. Vezanje antigena iz uzorka onemogućava vezanje antigena „obloženog“ enzimom koji se ispiranjem uklanja. Ispiranjem će supstrat ostati nepromijenjen, odnosno bezbojan, stoga je ovdje intenzitet nastale boje obrnuto proporcionalan koncentraciji analita (Immer i Lacorn, 2015).



Slika 4. Shematski prikaz kompetitivne ELISA metode (Đurišić i sur., 2003)

2.4.2. Primjena ELISA metode u određivanju alergena kikirikija

Različite tehnike ELISA metode danas se široko primjenjuju za određivanje alergena kikirikija u prehrambenim proizvodima zbog svoje osjetljivosti, brzine i prikladnosti. Neke određuju i kvantificiraju ukupne topljive proteine kikirikija u hrani dok su druge dizajnirane za određivanje ciljanih alergena (npr. Ara h 1 ili Ara h 2) (Schmitt i sur., 2004). ELISA metode koje se baziraju na monoklonskim antitijelima, a za utvrđivanje alergena kikirikija Ara h 1 u hrani vrlo su dobro razvijene (Peng i sur., 2014).

Prva ELISA metoda za određivanje ostataka kikirikija opisana je 1994. godine pri čemu su korištena monoklonska antitijela s molekulskom masom 14-44 kDa kao 'hvatači', dok su poliklonska antitijela zeca korištena kao detektori alergena. Metoda je mogla detektirati količinu kikirikija < 40 ppm u većini hrane. Suho prženi kikiriki u količini od 0,01–5,0 % unesen je u sladoled od vanilije i potom testiran ELISA metodom i kožnim testom (*skin-prick test*) u sedam alergičnih osoba. Pri najnižoj ispitivanoj razini (0,01 % = 100 ppm) kožni test je bio osjetljiviji od ELISA metode u šest od sedam pacijenata. Uzorci sladoleda također su ispitani i RAST testom gdje su rezultati bili proporcionalni i korelirali s rezultatima dobivenim ELISA metodom (Hefle i sur., 1994).

Koppelman i suradnici (1996) su opisali "sendvič" ELISA metodu gdje su korištena poliklonska antitijela zeca i djelomično pročišćen protein Ara h 1 iz sirovog kikirikija, dok su kao detektor

antitijela korištena ista antitijela obilježena peroksidazom. Rezultati su pokazali da je prženi kikiriki nešto manje reaktivan od sirovog, a također metoda nije pokazala križnu reaktivnost s većinom ostalih leguminoza. U 25 ispitivanih uzoraka hrane nije detektirana prisutnost kikirikija. Metoda je mogla mjeriti prisutnost proteina u sirovom i prženom kikirikiju, a limit detekcije iznosio je $0,1 \text{ mgkg}^{-1}$ (Koppelman i sur., 1996).

Holzhauser i Vieths (1999) su opisali indirektnu ELISA metodu s limitom detekcije $0,2 \text{ mgkg}^{-1}$ koja nije pokazivala križnu reaktivnost s ostalim sastojcima u ispitivanom uzorku. Od 17 uzoraka prehrambenih proizvoda na kojima nije bio deklariran kikiriki, isti je detektiran u njih 5 u koncentraciji od 2–18 ppm (Holzhauser i Vieths, 1999).

Danas su na tržištu dostupni ELISA kitovi s limitom detekcije od $0,1 \text{ mgkg}^{-1}$ za Ara h 1, $0,5 \text{ mgkg}^{-1}$ za Ara h 2 te $2,5 \text{ mgkg}^{-1}$ za ostale proteine kikirikija. Limit kvantifikacije varira u rasponu od 1-20 i 1-15 mgkg^{-1} za Ara h 1 odnosno Ara h 2 te 3,3-90 mgkg^{-1} za ostale proteine (Fielder i sur., 2010).

2.5. ZAKONSKA REGULATIVA

Proizvodi s kikirikijem i hrana koja ga sadrži popularni su diljem svijeta, ipak za osobe s alergijom na ovu mahunarku, konzumacija može prouzročiti po život opasne probleme. Smrtni slučajevi nakon konzumacije kikirikija u alergičnih osoba zabilježeni su u Kini i Sjedinjenim Američkim Državama (Ji i sur., 2009). Istraživanje provedeno 2004. je pokazalo kako 0,8 % adolescenata i 0,6 % odraslih u SAD-u imaju alergiju na kikiriki (Sampson, 2004). U Francuskoj 1 % populacije ima alergiju na kikiriki, a njezina učestalost se povećala od prošlog desetljeća (Kanny i sur., 2001).

Deklariranje, odnosno označavanje hrane predstavlja učinkovitu i lako razumljivu metodu kako bi se alergične osobe zaštitile od slučajne konzumacije proizvoda koji sadrže kikiriki. 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 EU, 2011). Označavanje hrane jedno je od najsloženijih zakonski uređenih područja vezanih za hranu i najvažniji moment u komunikaciji subjekta u poslovanju s hranom s potrošačima. Ono mora u potpunosti informirati potrošače o hrani koju konzumiraju te zaštititi njihovo zdravlje i interese. U Hrvatskoj se od 13. prosinca 2014. godine obvezno primjenjuje Uredba (EU) br. 1169/2011 o informiranju (Pravilnik, 2013; Pravilnik, 2014). Cilj Uredbe br. 1169/2011 bio je

pojednostaviti postojeće propise o označavanju hrane radi jedinstvene primjene te omogućiti izbor hrane koji odgovara prehranbenim potrebama pojedinca.

Tvari ili proizvodi koji uzrokuju alergije ili intolerancije obavezno je označiti u popisu sastojaka i dodatno naglasiti uporabom vrsta pisma koje se jasno razlikuje od vrste pisma ostalih sastojaka, na primjer slovima, stilovima ili bojama u pozadini. Obavezno je označavanje sljedećih alergena: 1. žitarice koje sadrže gluten (pšenica, raž, ječam, zob, pir, kamut ili njihovi hibridi) i proizvodi žitarica; 2. rakovi i proizvodi od rakova; 3. školjkaši i ostali mekušci te proizvodi od njih; 4. jaja i proizvodi od jaja; 5. proizvodi ribarstva; 6. kikiriki i proizvodi od kikirikija; 7. soja i proizvodi od soje; 8. mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući i laktozu); 9. orašasti plodovi (badem *Amygdalus communis L.*, lješnjak *Corylus avellana*, orah *Juglans regia*, indijski oraščić-kešu *Anacardium occidentale*, pekan oraščić *Carya illinoensis*, brazilski oraščić *Bertholletia excelsa*, pistacija *Pistacia vera*, makadamija oraščić *Macadamia ternifolia*) i njihovi proizvodi; 10. celer i proizvodi od celera; 11. gorušica i proizvodi od gorušice; 12. lupina i proizvodi od lupine.

U drugim zemljama, poput Sjedinjenih Američkih Država, Kanade, Australije i Novog Zelanda obavezno je označavanje alergena, ali je taj popis reduciran. Tako američka organizacija odgovorna za donošenje zakona o hrani FDA (engl. *Food and Drug Administration*), navodi osam kategorija izvora alergena koji predstavljaju 90 % svih nutritivnih alergija. Zemlje Zapada, uključujući i SAD zahtijevaju točne informacije alergena na uvezenoj i izvezenoj hrani. Trgovina hranom između Kine i Zapadnih zemalja je u porastu (McKay, 2007). Međutim, 2005. godine od ukupne uvezene hrane iz Kine, jedna četvrtina odbijena je od strane američke agencije za hranu i lijekove (FDA) zbog netočnih informacija o označavanju hrane (Zhou, 2007). Naime, Kina još nije bila izdala zakone o označavanju hrane zbog čega je informacije o alergenima trebala provjeriti kineska carina kako bi se izbjegle sporne situacije prilikom trgovine (Ji i sur., 2009).

U Japanu je obavezno deklariranje samo za pšenicu, heljdu, jaja, mlijeko, kikiriki i rakove.

U 2003. godini regulativa o označavanju hrane uvedena je u Australiju i Novi Zeland po uzoru na slične zakone predstavljene od Europske komisije (Direktiva 2003/89/EC). Sadašnje australsko zakonodavstvo zahtjeva obavezno označavanje najčešće alergene hrane (kikiriki, orašasti plodovi, mlijeko, jaja, sezam, riba i rakovi, soja te gluten) kao i proizvoda dobivenih iz ove hrane (FSANZ, 2002).

Alergena hrana prisutna na gotovo svim regulativama je mlijeko, jaja, žitarice koje sadrže gluten, rakovi, kikiriki te orašasti plodovi. Navođenje ostalih alergena poput celera, senfa,

mekušaca, heljde i lupine ovisi o prehranbenim navikama određenog geografskog područja, gdje su ljudi ovisno o tim navikama izloženi različitom stupnju rizika (Muraro i sur., 2014).

Što se tiče informacije o mogućoj i nenamjernoj prisutnosti u hrani tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili intolerancije većina subjekata u poslovanju s hranom dobrovoljno iz predostrožnosti navodi/upozorava na nenamjernu prisutnost alergena kako bi informirali potrošače. Na tržištu se koristi jako puno različitih izraza poput: "Sadrži tragove [alergen] ", "Može sadržavati [alergen] ", "Proizvedeno na proizvodnoj liniji gdje i [alergen] ", "Proizvodi se u tvornici koja također koristi [alergen] ".

Ovakav način označavanja može nepotrebno dovesti potrošača u zabludu ima li u proizvodu alergena ili nema, a također pokazuje i nemogućnost kontrole tehnoloških procesa i lošu proizvođačku praksu u proizvodnji i skladištu. Potrošači često ignoriraju takve poruke, a različiti izrazi mogu se pogrešno protumačiti da znače različite razine rizika. Kao posljedica, izbor za kupca se nepotrebno ograničava ili su potrošači izloženi riziku ako odluče zanemariti upozorenja (Zurzolo i sur., 2013).

Unatoč velikim naporima proizvođača, skriveni alergeni i dalje predstavljaju problem. Mogu se pojaviti u hrani i proizvodima zbog križne kontaminacije ako se upotrebljava zajednička oprema ili postrojenje, zbog pogrešaka u pakiranju ili pitanja koja se odnose na opskrbni lanac. Hefle i suradnici su u svom radu došli do zaključka kako sve veći broj potrošača s alergijom na kikiriki zapravo ignorira navode u okviru informacija o hrani zbog povećanja njihove upotrebe, a bez obzira na relevantnost informacija (Hefle i sur., 2007).

Oznaka "Bez alergena" (engl. "Free from") je tvrdnja koja izričito negira postojanje nekog alergena. Ona je upitna i opasna jer uvjerava potrošača da alergena sastojka nema u potpunosti, dok u analitičkom smislu znači da se količina ne može detektirati postojećim analizama i metodama.

2.6. DIJETOTERAPIJA NUTRITIVNIH ALERGIJA

Liječnici, nutricionisti i ostali zdravstveni djelatnici imaju veoma važnu ulogu u pružanju informacije u svezi učinkovitog izbjegavanja potencijalno alergeni namirnica (Clark i Ewan, 2008). Osnovu svake terapije nutritivne alergije čini dijeta, pa se i veliku važnost treba pridati kombiniranju obroka. Kad pojedine namirnice izbacimo iz prehrane, potrebno je nutrijente, koje zbog toga ne unosimo, nadomjestiti iz nekih drugih izvora. U literaturi se navode dvije osnovne vrste dijeta: eliminacijska i provokacijska dijeta.

Kada je pojedincu postavljena dijagnoza nutritivne alergije, najučinkovitija terapija je eliminacijska dijeta, odnosno izbacivanje određene namirnice iz prehrane. Postoje nekoliko vrsta eliminacijskih dijeta: inicijalna, oligoantigenska, elementarna i dijeta koja zabranjuje svu hranu, osim vode.

Kod inicijalne eliminacijske dijetе se, nakon identifikacije alergena, pacijentu daju namirnice s niskim potencijalom da izazovu nutritivnu alergiju (npr. janjetina, mrkva, grašak, krumpir, riža, tjestenina i med). Pacijent potom bilježi sav unos pića, lijekova i hrane te prati svoja opažanja, a ukoliko određena namirnica izazove smetnje, mora je odmah prestati uzimati i obratiti se liječniku. Ova dijeta mora se ograničiti na 10-14 dana (Garrow i sur., 2000).

Oligoantigenska dijeta je slična inicijalnoj, a sastoji se također od samo jedne vrste mesa (janjetina ili perad), povrća (kupus, kelj, špinat ili mrkva), voća (breskve, jabuke ili kruške) i ugljikohidratne hrane. Dijeta se provodi dva do četiri tjedna, uz isključivo konzumiranje vode.

Elementarne dijetе sastoje se od oligopeptida i aminokiselina, hidrolizata škroba, disaharida i jednostavnih šećera te minimalnih količina masti. Rijetka je mogućnost, ali ipak postoji, da neki bolesnici reagiraju i na hidrolizate škroba bez proteina.

Provokacijske dijetе temelje se na tome da se inkriminirajući nutritivni alergen isključi iz prehrane pa se zatim ponovno daje u određenim intervalima. Tako se ujedno najbrže i najpouzdanije dvostrukim slijepim pokusom otkrivaju bolesnici koji nemaju nikakvu nutritivnu alergiju (Gennaro, 2000).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Za potrebe izrade diplomskog rada sakupljeno je 16 uzoraka različitih nepretpakiranih kolača koji sadrže kakaove dijelove u kojima je određen udio potencijalnih alergena kikirikija ELISA metodom. Svi uzorci su kupljeni na zagrebačkom tržištu s tri različita mjesta: slastičarnice, objekta javne prehrane, odnosno studentske kantine i trgovačkog lanca. Po 5 uzoraka uzeto je iz slastičarnice i objekta javne prehrane te 6 uzoraka iz trgovačkog lanca. Uzorci su označeni sljedećim oznakama: od KS₁ do KS₅ za uzorke kolača iz slastičarnice, od KO₁ do KO₅ za uzorke iz objekta javne prehrane te od KT₁ do KT₆ za uzorke iz maloprodajnog lanca.

3.1.2. Ispitanici

U svrhu prikupljanja stavova i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije, odnosno o prisutnosti tragova kikirikija u nepretpakiranim kolačima koji sadrže kakao proveden je upitnik (Prilog 1) na uzorku od 76 ispitanika starijih od 18 godina koji su dobrovoljno pristali sudjelovati u anketiranju.

3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor

Tijekom istraživanja korišteni su sljedeći uređaji:

- analitička vaga (YMC Chyo, tip JK-180 Mikrotehna, Zagreb)
- vortex (VWR, tip VV3)
- vodena kupelj (INKO, Zagreb)
- ELISA-čitač s filerom od 450 nm sa računalnim programom Gen 5, Bio Tek Instruments, SAD (slika 5)
- centrifuga (Rotofix 32A, Hettich, Njemačka) (slika 6)



Slika 5. ELISA Microplate reader



Slika 6. Centrifuga

Korišteno je sljedeće posuđe i pribor:

- automatska jednokanalna pipeta
- boca štrcaljka
- Eppendorf plastične posudice

- Erlenmeyerove tikvice
- filter-papir
- laboratorijska čaša od 100 mL
- laboratorijska čaša od 250 mL
- metalni stalak za epruvete
- nastavak za pipetu
- nosač za mikrožalice, AgraQuant, Romer Labs, Austrija
- odmjerna tikvica od 10 mL
- odmjerna tikvica od 200 mL
- pipeta od 1 mL
- pipeta od 10 mL
- stakleni lijevak
- stakleni štapić
- 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 7)
- AgraQuant-Substrate, Romer Labs, Austrija (reagens s plavim poklopcem) (slika 7)
- AgraQuant-Stop Solution, Romer Labs, Austrija (reagens s crvenim poklopcem) (slika 7)
- Filtrat pročišćenog uzorka



Slika 7. Reagensi iz seta za ELISA test

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema reakcijskih otopina

Otopine ekstrakcijskog pufera i pufera za ispiranje pripremljene su u potrebnoj količini za svaki radni dan.

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

Koncentrat pufera za ispiranje razrijeđen je destiliranom vodom u omjeru 1:10 i čuvan pri 4°C.

Tako pripremljene otopine, neposredno prije upotrebe, izvađene su iz hladnjaka kako bi se temperirale i mogle koristiti.

3.2.2. Priprema uzoraka / ekstrakcija

Reprezentativni uzorak kolača dobro je mehanički homogeniziran, a potom je na analitičkoj vagi izvagan 1,0000 g tako homogeniziranog uzorka, dodano 20 mL ekstrakcijskog pufera i sve zajedno vorteksirano do potpune homogenizacije uzorka u ekstrakcijskom puferu. Dobivena

suspenzija inkubirana je petnaest minuta u prethodno ugrijanoj vodenoj kupelji pri 60 °C uz snažno protresivanje svake dvije minute.

Zatim je suspenzija centrifugirana 10 minuta na 2 000 okretaja kako bi se dobio bistri supernatant. Budući da su nakon centrifugiranja u supernatantu bile prisutne čestice, on je profiltriran pomoću lijevka i filter-papira, a dobiveni filtrat je sakupljen za određivanje udjela potencijalnih alergena kikirikija ELISA testom.

3.2.3. ELISA test

3.2.3.1. Princip određivanja

AgraQuant kikiriki test, korišten u ovom istraživanju, obzirom na tehniku određivanja pripada "sendvič" 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 ispiranja, u mikrojažice se dodaje enzimom obilježeno sekundarno antitijelo te određeno vrijeme inkubira. Ponovno slijedi korak ispiranja i dodavanje supstrata za enzim pri čemu dolazi do razvitka plave boje. Intenzitet obojenja proporcionalan je koncentraciji proteina kikirikija u uzorku (ili standardu). Nakon određenog vremena u mikrojažice se dodaje "stop" otopina pri čemu plavo obojenje prelazi u žuto. Intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski pri 450 nm, a temeljem baždarnog dijagrama standarda kikirikija (slika 9) određuje se koncentracija potencijalnih alergena kikirikija (mgkg^{-1}).

3.2.3.2. Postupak određivanja

Set od osam mikrojažica obloženih antitijelom postavljen je na držač, a ostale neiskorištene mikrojažice vraćene su u vrećicu s desikantom te čuvane za sljedeće mjerenje. Pomoću jednokanalne pipete dodano je 100 μL dobivenog filtrata u jažicu. Za svaki uzorak korišten je novi nastavak za pipetu te je sadržaj nastavka u potpunosti ispražnjen u jažicu.

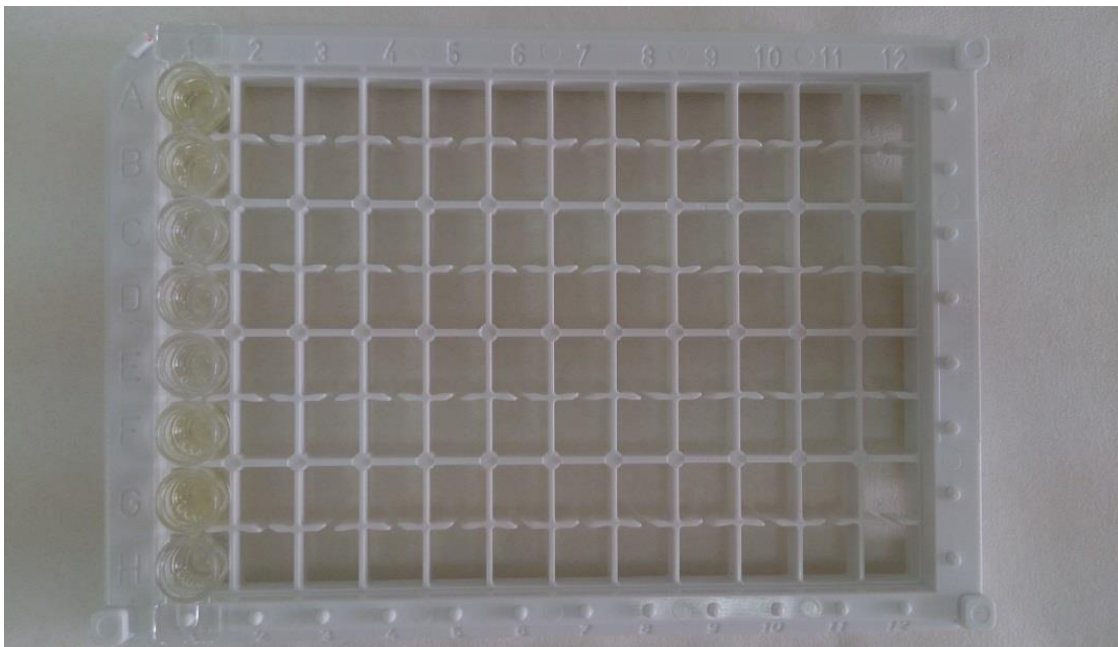
Potom je držač s jažicama inkubiran pri sobnoj temperaturi 20 minuta nakon čega je sadržaj mikrojažica ispražnjen u otpadni spremnik. Svaka jažica 5 puta je isprana s razrijeđenim puferom za ispiranje. Na ravnu površinu je posloženo nekoliko slojeva staničevine te su o nju lupkane mikrojažice u svrhu uklanjanja zaostale vode i potpunog sušenja.

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

Nakon toga, 100 μL supstrata iz bočice s plavim poklopcem stavljeno je u svaku jažicu i inkubirano pri sobnoj temperaturi 20 minuta u tami.

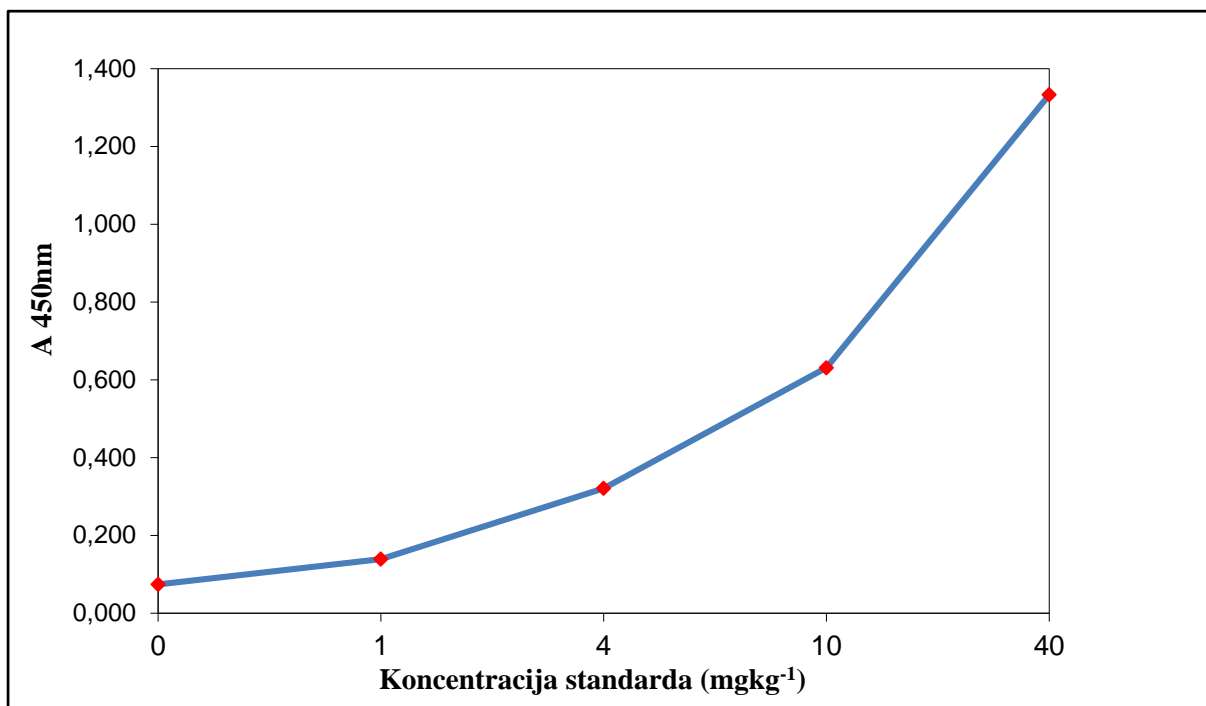
Nakon inkubacije u tami, 100 μL „stop“ otopine iz bočice s crvenim poklopcem dodano je u svaku jažicu nakon čega je došlo do promjene boje iz plave u žutu.

Držač s mikrojažicama (slika 8) pažljivo je prenesen do čitača s filterom od 450 nm, a OD-vrijednosti za svaku mikrojažicu pohranjene.



Slika 8. Držač s mikrojažicama

Na osnovu prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda kikirikija (slika 9), određena je koncentracija kikirikija u svakom od analiziranih uzoraka. Koncentracije otopina standarda iznosile su 0, 1, 4, 10 i 40 mgkg^{-1} .



Slika 9. 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, odnosno o prisutnosti tragova kikirikija u kolačima koji sadrže kakaove dijelove. Upitnik je proveden na uzorku od 76 ispitanika (18 muškaraca i 58 žena) starijih od 18 godina na području grada Zagreba i Krapinsko-zagorske županije.

Cilj upitnika bio je dobiti uvid u stavove i mišljenja potrošača vezano za nutritivne alergije; asocijacije na navode u okviru informacija o hrani vezane uz prisutnost alergena; razumijevanje deklariranog te percepciju sigurnosti hrane. Upitnik se sastoji od tri grupe pitanja: prva grupa pitanja vezana je uz socio-demografske karakteristike ispitanika, a ostale dvije su usko vezane uz nutritivne alergije te kikiriki kao jedan od najčešćih alergena. Dva pitanja su otvorenog tipa dok su ostala zatvorenog; 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 standardne metode deskriptivne statistike (\bar{X} - srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, udio ispitanika (%)).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovog istraživanja ELISA testom određen je udio potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima nepretpakiranih kolača koji sadrže kakaove dijelove. 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 potrošača, prikupljeni putem upitnika, prikazani su grafički na slikama 10-16.

4.1. UDIO POTENCIJALNIH ALERGENA KIKIRIKIJA ODREĐENIH ELISA TESTOM U UZORCIMA KOLAČA KOJI SADRŽE KAKAOVE DIJELOVE

Tijekom ovog istraživanja proveden je ELISA test kojim je kvantitativno određena prisutnost alergena kikirikija u uzorcima kolača koji sadrže kakaove dijelove. Set za ELISA test AgraQuant Peanut Assay nabavljen je od proizvođača Romer Labs, Austrija. Limit detekcije ELISA testa iznosi $0,10 \text{ mgkg}^{-1}$. Koncentracija alergena kikirikija izražena je u mgkg^{-1} .

Usporedno s rezultatima ELISA testa, tablično su prikazani navodi u okviru informacija o hrani pripadajućih analiziranih proizvoda (tablica 3 i 5) koji su neposredno vezani uz eventualnu prisutnost alergena kikirikija. Rezultati određivanja (tablica 2, 4 i 6) prikazuju prisutnost alergena kikirikija u 14 od ukupno 16 kolača koji sadrže kakaove dijelove analiziranih ELISA testom.

Rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima iz trgovačkog lanca prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n=6$) kolača iz trgovačkog lanca

Uzorak	Udio alergena kikirikija [mgkg^{-1}] (srednja vrijednost \pm SD)
KT ₁	1,17 \pm 0,001
KT ₂	0,86 \pm 0,000
KT ₃	0,11 \pm 0,006
KT ₄	<LOD*

Tablica 2. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n=6$) kolača iz trgovačkog lanca (nastavak)

Uzorak	Udio alergena kikirikija [mgkg^{-1}] (srednja vrijednost \pm SD)
KT ₅	0,21 \pm 0,012
KT ₆	1,37 \pm 0,012
Prosječna vrijednost	0,62
Raspon	0,11-1.37

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

Prisutnost alergena kikirikija detektirana je u pet od ukupno šest uzoraka kolača. U uzorku „KT4“ nije potvrđena prisutnost alergena kikirikija, odnosno dobivena koncentracija je ispod limita detekcije (LOD) što je sukladno s navodima u okviru informacija o hrani (tablica 3).

Najviša koncentracija alergena kikirikija ($1,37 \text{ mgkg}^{-1}$) određena je u uzorku „KT6“ unatoč tome što ne sadrži navod o prisutnosti kikirikija.

Tablica 3. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka kolača iz trgovačkog lanca vezani uz prisutnost alergena kikirikija

Uzorak	Navod vezan uz prisutnost alergena
KT ₁	Mogući su tragovi badema, oraha i kikirikija
KT ₂	Mogući su tragovi badema, oraha i kikirikija
KT ₃	Bez navoda
KT ₄	Alergeni: gluten, jaja, mlijeko
KT ₅	Mogući su tragovi badema, lješnjaka, oraha i kikirikija
KT ₆	Može sadržavati u tragovima lješnjak i ostale orašaste plodove

U istraživanju provedeno u Nebraski, 200 različitih zapakiranih proizvoda ispitano je na sadržaj kikirikija. Uzorci su uključili 179 proizvoda sa savjetodavnim navodima o alergenima te 21 proizvod gdje je kikiriki naveden u popisu sastojaka u okviru informacija o hrani. Proizvodi su bili iz različitih kategorija uključujući energetske pločice, žitarice, slatkiše, grickalice, smrznute deserte, brze obroke, sastojke za pečenje te pekarske proizvode. Za svaki proizvod uzete su

dvije šarže što je dalo ukupno 400 uzoraka. Kikiriki je detektiran u najmanje jednoj šarži u 10 % (20/200) od svih testiranih proizvoda.

Od 179 proizvoda sa savjetodavnim navodima o alergenima, 13 proizvoda je bilo pozitivno na sadržaj kikirikija u jednoj ili obje šarže, uključujući 2 od 51 proizvoda s navodom “može sadržavati”, 3 od 57 proizvoda s navodom “zajednička oprema”, 7 od 68 proizvoda s navodom “zajedničko postrojenje” te 1 od 3 proizvoda s posebnim navodom o prisutnosti alergena. Tragovi kikirikija detektirani su u energetske pločicama (4/28 uzoraka), slatkišima (7/36) te u žitaricama (2/26). Nasuprot tome, tragovi kikirikija nisu detektirani ni u jednom od proizvoda sa savjetodavnim navodom o alergenima iz kategorije grickalica (0/25), sastojaka za pečenje (0/15), pekarskih proizvoda (0/32), smrznutih deserata (0/9) te brzih obroka (0/8).

Od 21 proizvoda gdje je kikiriki naveden u popisu sastojaka na informaciji o hrani, 7 proizvoda je sadržavalo kikiriki. Detektirani tragovi kikirikija pronađeni su u energetske pločicama (2/2 uzorka), grickalicama (1/4), slatkišima (1/1) te žitaricama (3/11) (Hefle i sur., 2007).

U tablici 4 prikazani su rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima kolača koji sadrže kakaove dijelove iz slastičarnice. Udio potencijalnih alergena kikirikija kreće se u rasponu od 0,12 mgkg⁻¹ do 1,91 mgkg⁻¹.

Tablica 4. Udio (mgkg⁻¹) alergena kikirikija u uzorcima (n=5) kolača iz slastičarnice

Uzorak	Udio alergena kikirikija[mgkg⁻¹] (srednja vrijednost ± SD)
KS ₁	0,34 ± 0,015
KS ₂	0,57 ± 0,006
KS ₃	0,24 ± 0,012
KS ₄	0,12 ± 0,000
KS ₅	1,91 ± 0,000
Prosječna vrijednost	0,64
Raspon	0,12-1,91

Najviša koncentracija alergena kikirikija (1,91 mgkg⁻¹) određena je u uzorku „KS5“. U svih 5 uzoraka ELISA metodom je utvrđena prisutnost kikirikija iako on nije bio naveden na informaciji o hrani.

Ipak, na informaciji o hrani (tablica 5) u popisu sastojaka su navedene druge tvari koje mogu izazvati preosjetljivost ili intoleranciju poput: jaja, pšeničnog brašna, mlijeka, maslaca i sojinog lecitina, što je sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani.

Tablica 5. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih kolača iz slastičarnice vezani uz prisutnost alergena kikirikija

Uzorak	Navod vezan uz prisutnost alergena kikirikija
KS ₁	Bez navoda (jaja, pšenično brašno, maslac)
KS ₂	Bez navoda (mlijeko, pšenično brašno, maslac, jaja)
KS ₃	Bez navoda (vrhnje, jaja, sojin lecitin, pšenično brašno, maslac)
KS ₄	Bez navoda (jaja, pšenično brašno, maslac, mlijeko u prahu)
KS ₅	Bez navoda

U istraživanju Pele i suradnika (2007) analizirano je 315 vrsta kolača i 254 vrste čokolada koji su prikupljeni iz trgovina i supermarketa u 10 europskih zemalja (Austrija, Belgija, Bugarska, Češka, Mađarska, Poljska, Rumunjska, Slovačka i Nizozemska). Cilj rada bio je utvrditi vezu između rezultata dobivenih analitičkim metodama i informacija o alergenima kikirikija i lješnjaka danih informacijom o hrani. Obzirom na informacije o hrani, većina proizvoda nije imala deklarirane kikiriki ili lješnjak. Ipak, većina ih je sadržavala upozoravajuće navode o nenamjernoj prisutnosti ovih alergena u tragovima.

Valja napomenuti kako su se upozoravajući navodi ("može sadržavati" i "prisutno u okolišu"-tip označavanja) u zemljama koje su postale dio Europske unije prije 2004. godine (starije članice) odnosile uglavnom na orašaste plodove (18 % + 7 % = 25 %) u odnosu na specifičniju alergenu tvar poput kikirikija (8 % + 12 % = 20 %). Obrnuta situacija je primijećena u zemljama koje su se pridružile Europskoj uniji nakon 2004. godine sa samo 5 % (5 % + 0 %) kolača s upozoravajućim navodom o sadržaju orašastih plodova, naspram 44 % (12 % + 32 %) kolača s upozoravajućim navodom o sadržaju kikirikija.

Petnaest uzoraka kolača i šest uzoraka čokolade na kojima je deklariran kikiriki, podvrgnuti su analizi ELISA metodom. U osam uzoraka kolača i jednom uzorku čokolade nije detektirana prisutnost kikirikija.

Analizom uzoraka kolača na kojima nije deklariran kikiriki, u njih 68 (23 %) su ELISA metodom detektirani tragovi kikirikija. Limit kvantifikacije bio je 0,7 mgkg⁻¹. Od 68 uzoraka kolača pozitivnih na sadržaj kikirikija, približno polovica (47 %) je imala sadržaj kikirikija >20 mgkg⁻¹.

Rezultati ove studije pokazali su kako su tragovi alergena kikirikija i lješnjaka češće pronađeni u proizvodima s navodom "može sadržavati" u odnosu na one gdje nije bilo nikakvih navoda o sadržaju istih. Za čokoladu, veća količina lješnjaka (>20 mgkg⁻¹) je detektirana u onoj s navodom "može sadržavati", što nije bilo vidljivo i za kolače. Što se kikirikija tiče, nije se pokazalo da su veće količine kikirikija (>20 mgkg⁻¹) povezane s navodom "može sadržavati" (Pele i sur., 2007).

Rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija ELISA testom iz objekta javne prehrane, odnosno studentske kantine (tablica 6) pokazuju prisutnost alergena kikirikija u četiri od ukupno pet analiziranih uzoraka kolača koji sadrže kakaove dijelove.

Tablica 6. Udio (mgkg⁻¹) alergena kikirikija u uzorcima (n=5) kolača iz objekta javne prehrane

Uzorak	Udio alergena kikirikija[mgkg⁻¹] (srednja vrijednost ± SD)
KO ₁	<LOD*
KO ₂	0,17 ± 0,006
KO ₃	0,20 ± 0,000
KO ₄	0,12 ± 0,000
KO ₅	1,15 ± 0,000
Prosječna vrijednost	0,13
Raspon	0,12-1,15

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

U uzorku „KO₁“ nije potvrđena prisutnost alergena kikirikija s obzirom da je određena koncentracija ispod limita detekcije (LOD - engl. *Limit Of Detection*), a koji za korištenu ELISA metodu u ovom radu iznosi 0,10 mgkg⁻¹. Prag osjetljivosti definira se kao minimalna

količina hrane/alergena koja u osjetljivih pojedinaca može potaknuti alergijsku reakciju. Poms i suradnici (2004) ukazuju kako bi granice detekcije alergena kikirikija trebale biti 1 mgkg^{-1} ili niža. Preporučena granica detekcije u studiji Morisset i suradnika (2003) bila je viša od prethodno navedene te iznosila 24 mgkg^{-1} za hranu te 5 mgkg^{-1} za ulje. U ovom trenutku čini se kako su metode s granicom detekcije od 1 do 5 mgkg^{-1} najprihvatljivije (Kiening i sur., 2005).

Udio alergena kikirikija u pet analiziranih uzoraka kolača kreće se u rasponu od $0,12 \text{ mgkg}^{-1}$ do $1,15 \text{ mgkg}^{-1}$. Iako su detektirane koncentracije niske, istraživanja pokazuju da i vrlo mala količina proteina kikirikija (0,1-1000 mg) može izazvati alergijsku reakciju kod predisponiranih pojedinaca (Koppelman i sur., 2004).

Rezultati dobiveni analitičkom metodom se u ovom slučaju ne mogu usporediti s informacijama o hrani na proizvodu jer oni nisu sadržavali takve podatke. U Republici Hrvatskoj je od 13. prosinca 2014. godine na snazi Pravilnik o informiranju potrošača o nepretpakiranoj hrani (Pravilnik, 2014) koji obuhvaća zahtjeve kojima moraju udovoljiti subjekti u poslovanju s hranom (SPH) vezano uz navođenje informacija o prisutnosti sastojaka ili pomoćnih tvari u procesu proizvodnje, koji uzrokuju alergije ili intolerancije, kao i navođenje ostalih obveznih informacija o nepretpakiranoj hrani.

Kada se radi o obrocima poslužanima u restoranima, na štandovima ili dostavi tada je isticanje alergena nešto otežano. Stoga su Pravilnikom propisani alternativni uvjeti za informiranje potrošača o alergenima. Iznimno se informacije o alergenima mogu pružiti, uključujući i usmenu komunikaciju, na sljedeće načine:

- da se na vidljivom mjestu nalazi lako uočljiva, jasno čitljiva i po mogućnosti neizbrisiva obavijest kojom se potrošači pozivaju da se za informacije o prisutnosti tvari ili proizvoda koji uzrokuju alergije ili netolerancije u hrani obrate osoblju
- da su informacije dostupne u ispisanom obliku u objektu u kojem se hrana prodaje kako bi na zahtjev bile lako dostupne potrošaču i nadležnim inspekcijama
- da su informacije dostupne prije nego je hrana ponuđena na prodaju bez dodatnih troškova za potrošača.

U istraživanju kojeg su proveli Thomas i Mills (2006) izrađen je *on-line* upitnik čija je svrha bila istražiti koje nutritivne informacije potrošači smatraju važnima da budu sadržane na restorantskim menijima. Od 322 osobe koje su sudjelovale u istraživanju 316 ih je smatralo kako je detaljna lista sastojaka veoma važna. Ovisno o načinu prehrane kojeg slijede, zabilježeni su različiti odgovori. Tako su vegani i vegetarijanci naveli važnost informacija o

korištenju hrane animalnog podrijetla u samoj pripremi hrane. Osobe koje vode brigu o zdravom načinu života posebno su bile zahvalne na informacijama o dodanom šećeru (dijabetes), sadržaju masti, soli i kolesterola (hipertenzija i koronarne bolesti) te o energetske vrijednosti hrane (pretilost).

U odabiru hrane glavnu ulogu imale su alergije. Devet ispitanika je smatralo kako je važno da svaka potencijalno alergena hrana bude označena i kao takva, predstavljena potrošaču. Također, proces pripreme hrane je naveden kao važna stavka budući da utječe na alergenost namirnica. Potrošači s alergijama, specifičnim zdravstvenim tegobama ili oni koji slijede određeni način prehrane smatrali su kako nedostatak informacija na hrani iz restorana može ugroziti njihovo zdravlje. Navode i važnost poslužitelja hrane koji bi gostima trebali dati informacije o potencijalno alergenoj hrani (Thomas i Mills, 2006).

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

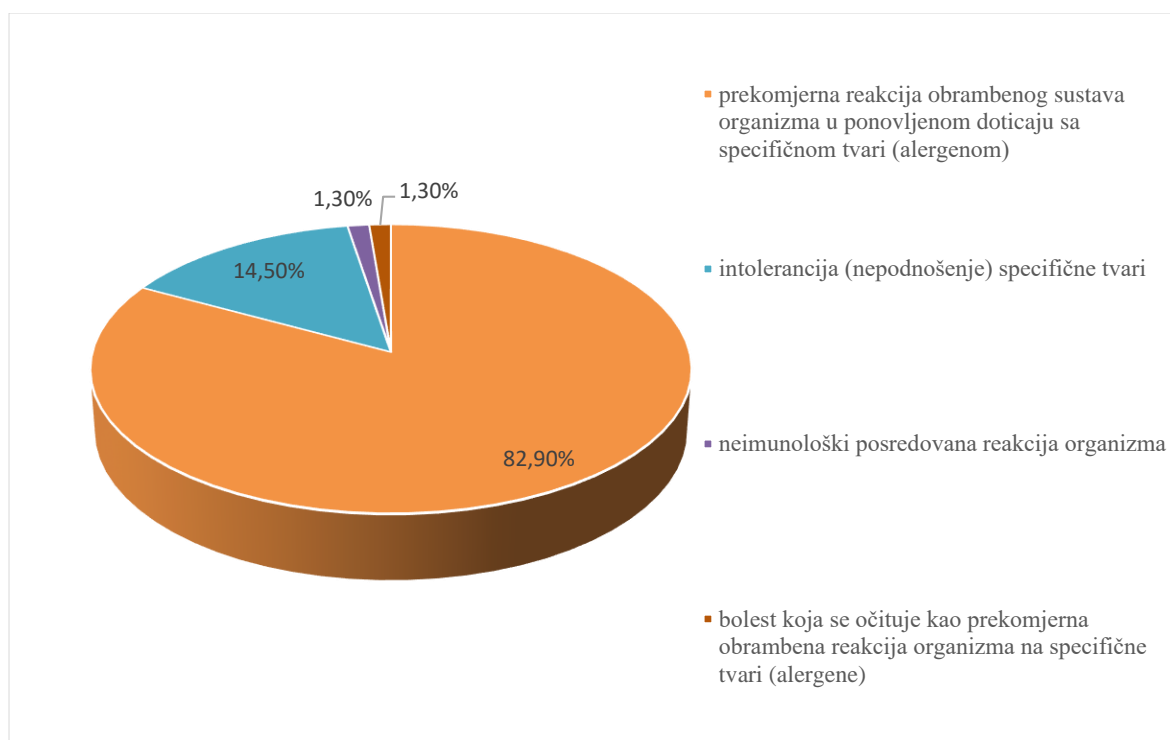
Tijekom ovog istraživanja ispitani su stavovi i mišljenja potrošača o kikirikiju i proizvodima od kikirikija kao tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije. Ispitivanje je provedeno putem posebno osmišljenog upitnika (Prilog 1) čiji je cilj bio dobiti uvid o stavovima i mišljenju potrošača o nutritivnim alergijama. Anketirano je 76 ispitanika. Odgovori upitnika prikazani su tablično i grafički.

U Tablici 7 prikazane su demografske karakteristike ispitanika (n=76). Od ukupno 76 ispitanika, žena je bilo 76,3 %, a muškaraca 23,7 %. Većina ispitanika (64,5 %) je bila u dobi od 18 do 30 godina, a s obzirom na životno okruženje samo je manji dio ispitanika (23,7 %) naveo kako živi na selu. Što se tiče obrazovanja, 26,3 % ispitanika je završilo srednju školu dok su ostali imali sveučilišni status.

Tablica 7. Demografske karakteristike ispitanika (n=76)

Demografski podaci	n	%
Spol		
Žene	58	76,3
Muškarci	18	23,7
Dob		
Studentska populacija (18-30 god)	49	64,5
Rana odrasla dob (30-40 god)	17	22,4
Srednja dob (40-60 god)	9	11,8
Kasna odrasla dob (>60 god)	1	1,3
Obrazovanje		
Osnovna škola	0	0
Srednja škola	20	26,3
Sveučilišna razina (fakultet)	56	73,7
Životno okruženje		
Selo	18	23,7
Grad	58	76,3
Ukupno	76	100

Na slici 10 prikazani su odgovori ispitanika na pitanje „Što je alergija?“. Vidljivo je kako je većina (82,9 %) upoznata s tim pojmom, no ipak 14,5 % smatra kako su alergija i intolerancija isti pojmovi. Valja napomenuti kako su to dva različita pojma gdje je važno razlikovati imunološki posredovanu reakciju na sastojak hrane (protein) i tada govorimo o alergiji na određenu hranu, te intoleranciju na određeni sastojak hrane (primjerice laktozu) koja nije posredovana imunološkim sustavom.



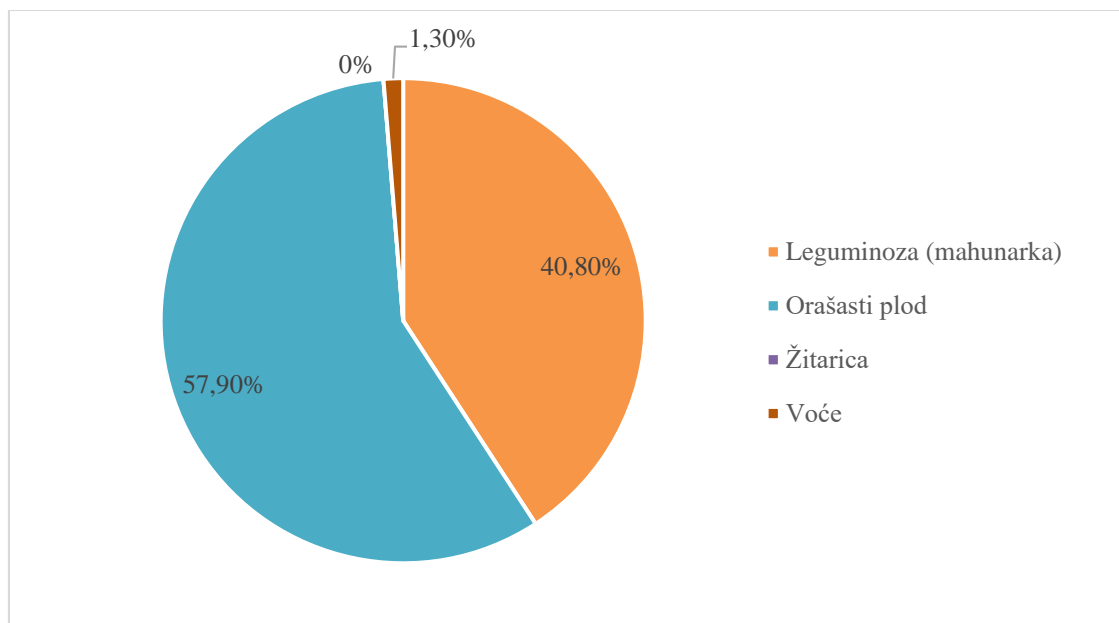
Slika 10. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=76) na pitanje „Što je alergija?“

Od ispitanika koji su se izjasnili da imaju nutritivnu alergiju (8), dvoje je alergično na kikiriki, dvoje na jagode te po jedan ispitanik na orašaste plodove, mango, kivi i naranču te riječnu ribu. Ostalih 68 ispitanika nema nutritivnu alergiju.

U istraživanju o znanju, stavovima i percepciji zaposlenika iz studentskih kantina o nutritivnim alergijama u Americi, ispitanici su također bili dobro upoznati (96,4 %) s definicijom nutritivne alergije i što bi osoblje trebalo učiniti po pitanju prevencije alergijskih reakcija (91,7 %). S druge strane, ispitanici su bili manje upoznati (46,4 %) kada ih se pitalo da identificiraju najčešće nutritivne alergene (Hee Choi, 2012).

Se-young i suradnici (2015) su proveli istraživanje o stavovima i preferencijama potrošača prema deklariranju alergena. Nutritivnu alergiju imalo je 130 (23,9 %) ispitanika, od čega je 95 imalo dijagnosticiranu alergiju od strane liječnika, dok ih je 35 postavilo samostalnu dijagnozu. Ostalih 413 od ukupno 543 ispitanika nije prijavilo nutritivnu alergiju. Najčešće su bile alergije na jaja (33,3 %), breskve (30,3 %), mlijeko (27,3 %), kikiriki (18,2 %) te rakove (18,2 %).

Svi ispitanici su se izjasnili kako je potrebno poboljšati određene stavke (font slova, boja slova, okvir informacije o hrani, upozoravajuće navode, potencijalne alergene) o nutritivnim alergenima na informacijama o hrani (Se-young i sur., 2015).



Slika 11. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=76) na pitanje „Što je kikiriki?“

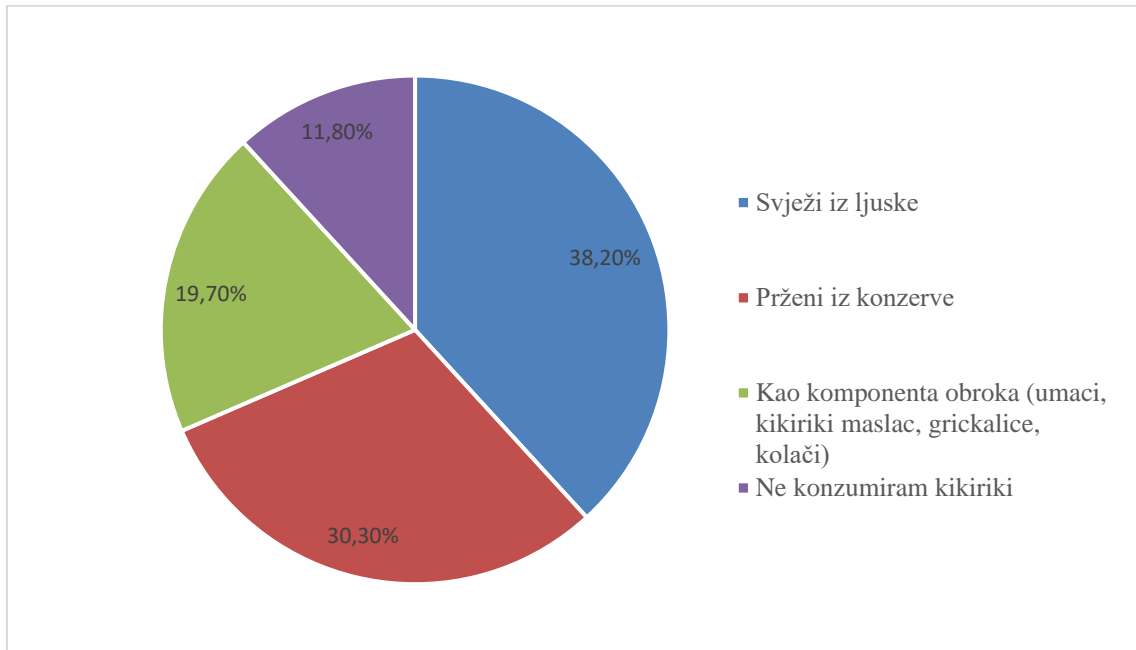
Na slici 11 prikazani su odgovori ispitanika na pitanje u koju skupinu namirnica se ubraja kikiriki. Više od polovice ispitanika (57,9 %) smatra kako se kikiriki ubraja u skupinu orašastih plodova, 40,8 % ispitanika svrstalo je kikiriki u ispravnu skupinu, skupinu leguminoza odnosno mahunarki dok je jedan odgovor bio da kikiriki pripada skupini voća (1,3 %). Niti jedan ispitanik nije svrstao kikiriki u skupinu „Žitarice“.

Rezultati određivanja udjela kikirikija ELISA testom u uzorku „KT6“ (tablica 2), koji je imao navod „Može sadržavati u tragovima lješnjak i ostale orašaste plodove“, a provedeni tijekom ovog istraživanja pokazuju kako je detektirana određena koncentracija potencijalnih alergena kikirikija.

Prema Pravilniku o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane (Pravilnik, 2011) kikiriki se nalazi u zasebnoj skupini alergena (Kikiriki i proizvodi od kikirikija), a navod o mogućoj prisutnosti ostalih orašastih plodova ne uključuje i kikiriki. Ovo dovodi u pitanje upućenost subjekta u poslovanju hranom s tom činjenicom te da li takvi navodi dovode potrošača na pogrešan zaključak.

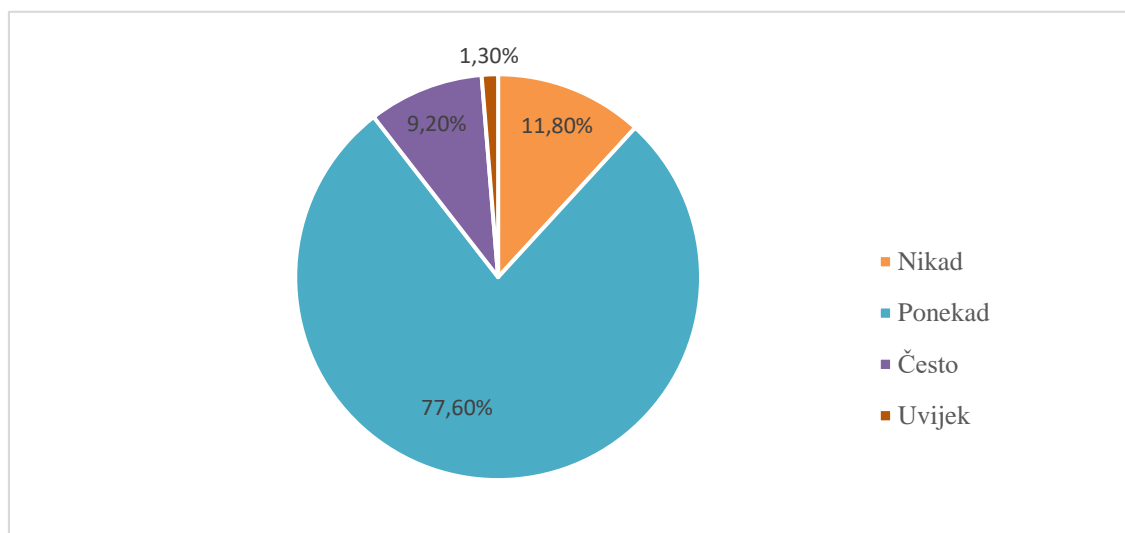
Na slici 12 prikazani su odgovori ispitanika o navikama vezanim uz način konzumacije kikirikija. Najviše ispitanika (68,5 %) odgovorilo je kako najčešće konzumira ili svježi kikiriki ili prženi iz konzerve. Manji dio (19,7 %) konzumira ga u sklopu obroka, što je i najrizičniji način za osobe s alergijom na kikiriki. Pojedinci s nutritivnim alergijama trebali bi izbjegavati rizične situacije poput konzumacije obroka izvan kuće, u restoranima te školama jer do

alergijske reakcije najčešće dolazi u pekarnicama, slastičarnicama i azijskim restoranima (Furlong i sur., 2001) gdje se kikiriki nalazi kao skriveni sastojak u različitim umacima, varivima i nedeklariranoj hrani poput začina i prirodnih aroma (Sicherer, 2002).



Slika 12. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=76) na pitanje „U kojem obliku najčešće konzumirate kikiriki?“

Kako je tijekom ovog istraživanja provedena analiza kolača prikupljenih s različitih prodajnih mjesta, jedno od pitanja vezalo se i uz učestalosti kupovanja kolača. Najviše ispitanika (77,6 %) odgovorilo je kako ponekad kupuje kolače s različitih prodajnih mjesta dok ih 11,8 % nikad ne kupuje (slika 13).

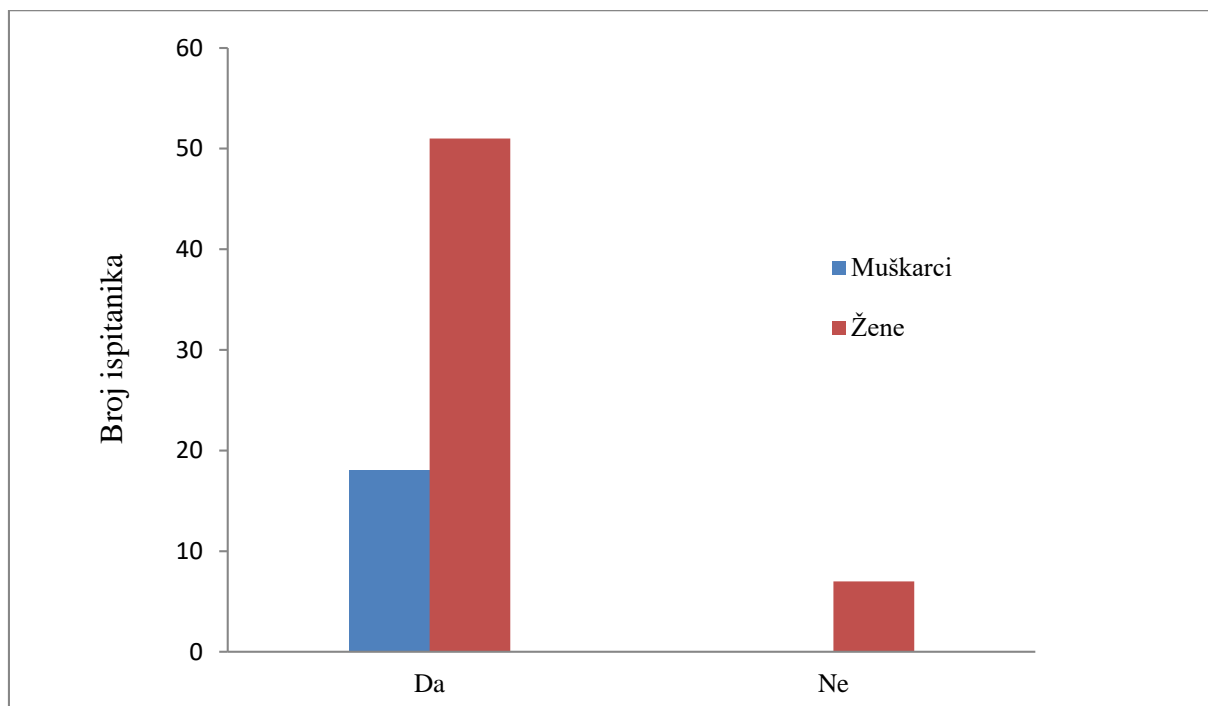


Slika 13. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=76) na pitanje „Kupujete li kolače na prodajnim mjestima poput slastičarnice, maloprodaje ili studentske menze?“

U istraživanju kojeg su proveli Kwon i Lee (2012) ispitani su stavovi i ponašanja potrošača s nutritivnim alergijama o konzumiranju obroka izvan vlastitog doma. Ispitanici su bili alergični na najčešće alergene kao i na one s nižom zastupljenošću poput voća, kukuruza, gljiva te kafeina. Većina ispitanika (n=10) je bilo alergična na više od jednog alergena iz hrane. Od 17 ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju, njih 8 je doživjelo alergijsku reakciju nakon konzumacije obroka u restoranima. Iako je nekoliko ispitanika imalo pozitivna iskustva s osobljem restorana vezanih za dobivanje informacija o alergenima, ipak navode kako nutritivne alergije imaju značajan utjecaj na kvalitetu života. Često imaju neugodna iskustva i nailaze na nerazumijevanje osoblja osobito ako se radi o rijetkim alergijama ili ako je u restoranu trenutna gužva te se zbog žurbe nehotice zanemare pojedinci s posebnim prehrambenim potrebama. Ispitanici smatraju kako su križna kontaminacija, skriveni sastojci u hrani te nesporazum u komunikaciji između konobara i kuhara potencijalni uzroci koji dovode do manifestacije alergijskih simptoma. Također navode kako zaposlenicima nedostaje znanja i svjesnosti o alergijama na hranu i njihovoj ozbiljnosti. Tako na primjer, kada je jedan sudionik dao do znanja da je alergičan na gljive, konobar mu je odgovorio kako nikad nije čuo za tu vrstu nutritivne alergije što jasno ukazuje na nedostatak znanja i nužnost edukacije. Kada se ispitanike pitalo o vrsti restorana kojeg bi izbjegli zbog nutritivnih alergija, naveli su etničke restorane kineske, talijanske i meksičke kuhinje zbog umaka koji se koriste u pripremi jela i restorane gdje se hrana poslužuje u obliku švedskih stolova (Kwon i Lee, 2012).

Furlong i suradnici (2008) su istraživali incidenciju alergijskih reakcija na kikiriki i orašaste plodove, a dobiveni rezultati ukazuju da se većina alergijskih reakcija na kikiriki i orašaste plodove dogodila u azijskim restoranima (13 %) i pekarnicama (14 %).

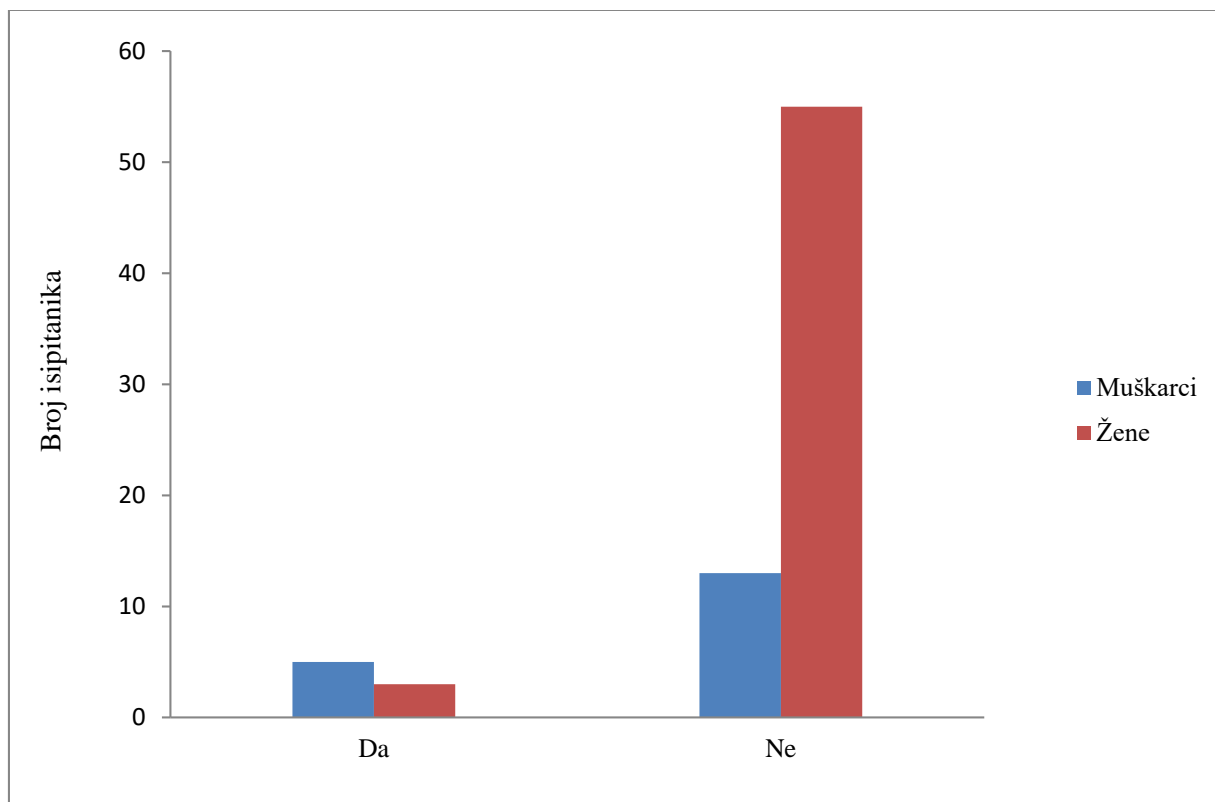
Odgovori ispitanika vezani uz prisutnost tragova kikirikija u kolačima koji sadrže kakaove dijelove prikazani su na slici 14. Od 76 ispitanika, 69 ih smatra kako takvi kolači mogu sadržavati tragove kikirikija, dok ih ostalih 7, od kojih su sve žene, ne smatra tako.



Slika 14. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=76), obzirom na spol, na pitanje „Smatrate li da kolači koji sadrže kakaove dijelove mogu sadržavati tragove kikirikija ?“

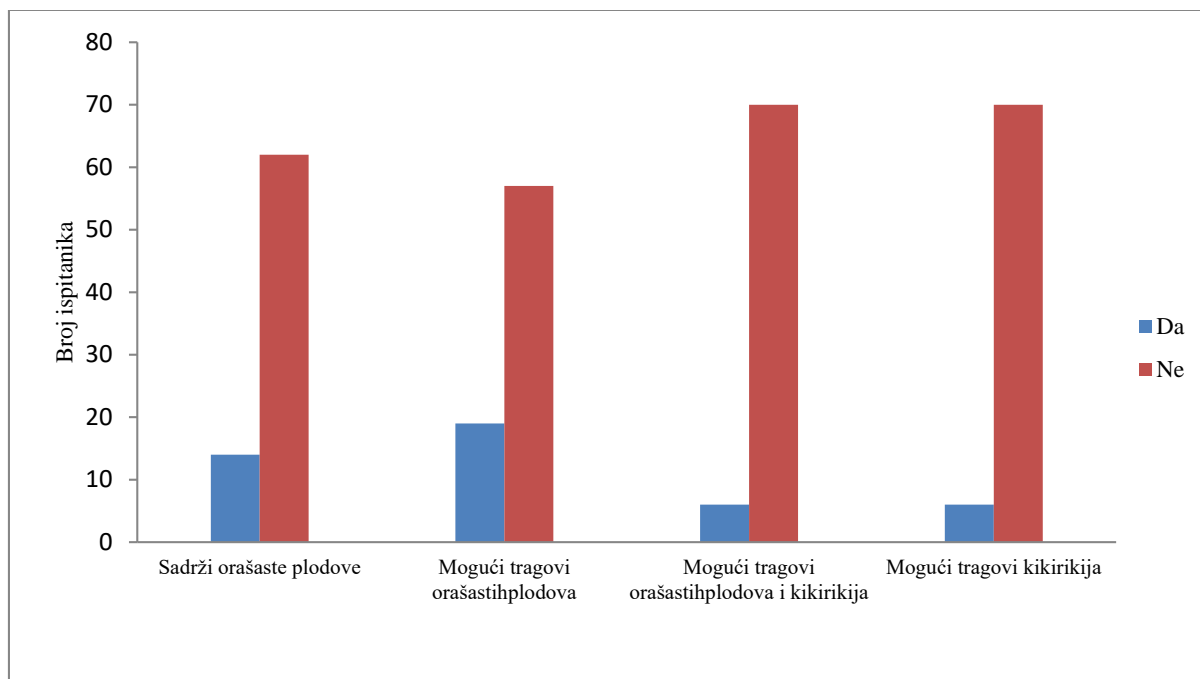
Nadalje, na pitanje da li bi kupili kolač koji nije deklariran (slika 15) većina muškaraca (72 %) i žena (94 %) je odgovorilo kako takve kolače ne bi kupili. Ovi odgovori ukazuju na svjesnost ispitanika na posljedice do kojih može doći konzumacijom alergeni namirnica u predisponiranih pojedinaca, a upravo su bomboni, čokoladni proizvodi, kolači i koncentri juha, proizvodi koje se najčešće povezuje s anafilaksijom (Sampson i sur., 2002).

Istraživanje Hrvatske agencije za hranu ukazuje na porast postotka građana koji izražavaju zabrinutost oko sigurnosti hrane. Naime 2010. godine taj postotak iznosio je 19 %, a 2011. godine 35 % (HAH, 2011).



Slika 15. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=76), obzirom na spol, na pitanje „Ako imate ili poznajete nekoga tko ima alergiju na kikiriki da li bi kupili kolač koji sadrži kakaove dijelove koji nije deklariran?“

Na slici 16 prikazani su odgovori ispitanika kada se radi o savjetodavnim navodima i upozorenjima o mogućoj prisutnosti alergena koje se sve češće pojavljuju na informacijama o hrani, a koje subjekti u poslovanju s hranom stavljaju kako bi se ogradili od mogućih tužbi potrošača. Vidljivo je kako 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 ukoliko bi one imale navedene navode.



Slika 16. Grafički prikaz odgovora ispitanika (n=76) na pitanje „Ako imate alergiju na kikiriki ili bi pripremali obrok za nekog s alergijom na kikiriki, da li bi koristili namirnice na kojima piše“

U istraživanju provedenom u Irskoj na proizvodima koji su sadržavali navode o sadržaju kikirikija, niske količine utvrđene su u samo 2 od 38 ispitivanih uzoraka (Hefle i sur., 2007). S obzirom na ove podatke, autori su raspravljali da li je uopće potrebno koristiti upozoravajuće navode s obzirom na količinu rizika te su došli do zaključka da se zbog sigurnosti osoba s alergijom na kikiriki ipak preporuča upotreba istih.

Nastavno na ovo istraživanje, Noimark i suradnici (2009) su istraživali tumačenje savjetodavnih prehrambenih navoda i također došli do rezultata kako pacijenti s alergijom na kikiriki često riskiraju na način da ili ignoriraju upozoravajuće navode ili pretpostavljaju da stupanj rizika ovisi o odabiru riječi u navodu. Obzirom na to, više pacijenata bi izbjegavalo proizvod ako je označen s 'Može sadržavati kikiriki' ('May contain peanut') u odnosu na proizvod koji je deklariran kao 'Može sadržavati tragove kikirikija' ('May contain traces of peanut').

Istraživanje provedeno u američkom supermarketu pokazalo je kako je 17 % proizvoda imalo upozoravajuće navode o nutritivnim alergenima koji su najčešće bili na proizvodima poput čokolada, kolača i pekarskih dobara (Pieretti i sur., 2009).

Pregledom dosadašnje literature vezane uz temu ovog rada, valja istaknuti kako veliki problem stvaraju skriveni alergeni, osobito u predisponiranih pojedinaca koji konzumacijom takvih

proizvoda mogu ugroziti svoje zdravlje, a u nekim slučajevima dovesti i do po život opasnog anafilaktičkog šoka (Wensing i sur., 2002). Zbog toga je sve češća praksa subjekata u poslovanju s hranom da stavljaju upozorenja o mogućoj prisutnosti alergena kako bi se ogradili od mogućih tužbi potrošača. Kao posljedica, izbor za kupca se nepotrebno ograničava ili su potrošači izloženi riziku ako odluče zanemariti upozorenja (Zurzolo i sur., 2013). Kako bi se smanjilo nerazumijevanje ili krivo razumijevanje navoda u okviru informacija o hrani na prehrambenim proizvodima nužna je edukacija i dobra komunikacija između proizvođača i potrošača. Usmena komunikacija osobito je važna na mjestima gdje se nudi nepretpakirana hrana koja ne sadrži informacije na ambalaži pa je osoblje dužno informirati potrošače o informacijama o alergenima. Također, zbog veće sigurnosti hrane potrebno je razviti sustav brze detekcije tragova alergena u prehrambenoj industriji te voditi računa o navedenoj problematici kroz zakonsku regulativu.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Za detekciju potencijalnih alergena kikirikija korištena je imunoenzimski ELISA metoda. U analiziranim uzorcima nepretpakiranih kolača koji sadrže kakaove dijelove iz slastičarnice detektirani su potencijalni alergeni kikirikija, a udio određen ELISA metodom kretao se u rasponu od $0,12 \text{ mgkg}^{-1}$ do $1,91 \text{ mgkg}^{-1}$.
2. Između analiziranih uzoraka kolača koji sadrže kakaove dijelove iz objekta javne prehrane i trgovačkog lanca, u dva uzorka nisu detektirani potencijalni alergeni kikirikija. Raspon udjela potencijalnih alergena kikirikija određenih ELISA metodom u ostalim analiziranim uzorcima kolača koji sadrže kakaove dijelove iz objekta javne prehrane iznosio je od 0,12 do 0,20 mgkg^{-1} dok se u analiziranim uzorcima čokoladnih kolača iz trgovačkog lanca kretao u rasponu od $0,11 \text{ mgkg}^{-1}$ do $1,37 \text{ mgkg}^{-1}$.
3. Samo uzorci iz trgovačkog lanca "KT₁" te uzorci "KT₂", "KT₃", sadrže i navod u okviru informacija o hrani vezan uz prisutnost alergena kikirikija.
4. Najviši udio alergena kikirikija ($1,91 \text{ mgkg}^{-1}$) određen je u uzorku „KS₅“ pri čemu uzorak ne sadrži navod o prisutnosti kikirikija.
5. Većina ispitanika (82,9 %) upoznata je s pojmom alergije, no njihova percepcija o tome u koju skupinu alergena se ubraja kikiriki često je pogrešna pa mnogi (57,9 %) smatraju kako se kikiriki ubraja u orašaste polodove.
6. 90,8 % ispitanika smatra kako kolači koji sadrže kakaove dijelove mogu sadržavati tragove kikirikija te 72 % ispitanika i 94 % ispitanica ne bi kupili kolač koji nije deklariran u slučaju da imaju ili poznaju nekoga tko ima alergiju na kikiriki.
7. Od šesnaest ukupno analiziranih uzoraka nepretpakirane hrane, u jedanaest uzoraka bez navoda o prisutnosti kikirikija, ELISA metodom detektirani su potencijalni alergeni kikirikija.

6. LITERATURA

- Ball, H., Luyt, D., Bravin, K., Kirkm, K. (2011) Single nut or total nut avoidance in nut allergic children: outcome of nut challenges to guide exclusion diets. *Ped. Allergy Immunol.* **22**, 808-812.
- Barnett, D., Howden, M.E.H. (1984) A rocket immunoelectrophoretic method for the detection of heat-treated peanut protein. *Food Technol. Aust.* **36**, 510– 511.
- Benjamini, E., Leskowitz, S. (1991) Immunology: a short course. New York: Wiley-Liss.
- Bernhisel-Broadbent, J., Scanlon, S. M., Sampson, H. A. (1992) Fish hypersensitivity. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 730-737.
- Besler, M., Kasel, U., Wichmann, G. (2002) Review: Determination of Hidden Allergens in Foods by Immunoassays. *Internet Symposium on Food Allergens* **4**, 1-18.
- 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(6)**, 1077–1081.
- Bošnjir, J., Colić Barić, I., Čurić, D., Mandić, M., Pollak, L., Teklić, T., Valek, M. (2009) Alergije podrijetlom iz hrane. HAH- Hrvatska agencija za hranu, <https://www.hah.hr/pdf/alergije_brosura.pdf>. Pristupljeno 15. listopada 2016.
- Boutrif, E. (1995) FAO programmes for prevention, regulation and control of mycotoxins in food. *Nat. Toxins* **3**, 322-326.
- Brandtzaeg, P. (2011) The gut as communicator between environment and host: Immunological consequences. *Europ. J. Pharm.* **668**, 16-32.
- Bunyavanich, S., Rifas-Shiman, S., Platts-Mills, T. A., Workman, L., Sordillo, J. E., Camargo, C. A., Gillman, M. W., Gold, D. R., Litonjua, A. A. (2014) Peanut, milk, and wheat intake during pregnancy is associated with reduced allergy and asthma in children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133(5)**, 1373–1382.

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

Chapman, J. A., Bernstein, I. L., Lee, R. E. (2006) Food allergy, a practice parameter. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **96**, 1–68.

Clark, A.T., Ewan, P.W. (2008) Good prognosis, clinical features, and circumstances of peanut and tree nut reactions in children treated by a specialist allergy center. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**, 286–289.

Cochrane, S., Beyer, K., Clausen, M., Wjst, M., Hiller, R., Nicoletti, C., Szepfalusi, Z., Savelkoul, H., Breiteneder, M., Manios, Y., Crittenden, R., Burney, P. (2009) Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy* **64**, 1246–1255.

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

Engvall, E., Perlman, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* **8**, 871-874.

Eriksson, N. E., Moller, C., Werner, S., Magnusson, J., Bengtsson, U. (2003) The hazards of kissing when you are food allergic. A survey on the occurrence of kiss-induced allergic reactions among 1139 patients with self-reported food hypersensitivity. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **13(3)**, 149–154.

EU (2003) European Commission. Directive 2003/89/EC of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 amending Directive 2000/13/EC as regards induction of the ingredients present in foodstuffs. *Off. J. Eur. Commun.* **308**, 15–18.

Fielder, R., Higgs, W., Barden, K. (2010) Nut allergen detection. U: Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists, (Popping, B., Diaz-Amigo, C., i Hoenicke, K. J., ured.), Wiley & Sons, Inc, New Jersey str. 377-406.

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

Pristupljeno 20. listopada 2016.

- Furlong, T. J., Desimone, J., Sicherer, S. H. (2001) Peanut and tree nut allergic reactions in restaurants and other food establishments. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108(5)**, 867–870.
- Furlong, T. J., McMorris, M. S., & Greenhawt, M. J. (2008). Self-reported allergic reactions to peanuts and tree nuts occurring in restaurants and food service establishments. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 248.
- Garrow, J. S., James, W.P.T., Ralph, A. (2000) Human nutrition and dietetics, 10. izd., Churchill Livingstone, Edinburgh, 756-64.
- Gennaro, A.R. (2000) The Science and Practice of Pharmacy. *Allergy*, **20**, 1580-1589.
- Geroldinger-Simic, M., Zelniker, T., Aberer, W., Ebner, C., Egger, C., Greiderer, A., Prem, N., Lidholm, J. K., Ballmer-Weber, B., Vieths, S. (2011) Birch pollen-related food allergy: Clinical aspects and role of allergen-specific IgE i IgG4 antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127(3)**, 616-622.
- Goldman, M. (1998) Peanut allergy: how much peanut is too much? Baltimore, Md.: Asthma and Allergy Foundation of America, Maryland-Greater Washington, D.C., Chapter Newsletter.
- HAH (2011) Percepcija građana RH o rizicima iz hrane. Hrvatska agencija za hranu, <https://www.hah.hr/arhiva/index_vijesti.php?id=792>. Pristupljeno 4. veljače 2017.
- Hee Choi, J. (2012) University foodservice employees' food allergy knowledge, attitudes, practices, training and training needs. *PhD Thesis*. Iowa State University.
- Hefle, S. L., Folgert, J. P., Chu, F. S., Bush, R. K. (1994) Monoclonal antibodies against selected peanut allergens: production and use as affinity agents. *Food Agric. Immunol.* **6**, 197–208.
- 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.
- Hefle, S. L., Nordlee, J. A., Taylor, S. L. (1996) Allergenic foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**, 69–89.

- Holzhauser, T., Stephan, O., Vieths, S. (2002) Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: a comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich ELISA. *J. Agric. Food Chem.* **50(21)**, 5808–5815.
- Holzhauser, T., Vieths, S. (1999) Indirect competitive ELISA for determination of traces of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein in complex food matrices. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 603–611.
- Hourihane, J. O. (2002) Recent advances in peanut allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2(3)**, 227–231.
- Hourihane, J. O., Kilburn, S. A., Dean, P., Warner, J. O. (1997) Clinical characteristics of peanut allergy. *Clin. Exp. Allergy* **27(6)**, 634–639.
- Hurst, W. J., Krout, E. R., Burks, W. R. (2002) A comparison of commercially available peanut ELISA test kits on the analysis of samples of dark and milk chocolate. *J. Immunoassay Immunochem.* **23(4)**, 451–459.
- Immer U., Lacorn M. (2015) Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detecting allergens in food. U: Handbook of Food Allergen Detection and Control, (Flanagan, S., ured.), Elsevier, Sawston, Cambridge, str. 199-217.
- Ji, K., Chen, J., Li, M., Liu, Z., Wang, C., Zhan, Z. (2009). Anaphylactic shock and lethal anaphylaxis caused by food consumption in China. *Trends Food Sci. Tech.* **20**, 227-231.
- Johansson, S. G., Hourihane, J. O., Bousquet, J. (2001) A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from EAACI nomenclature task force. *Allergy*, **56**, 813-824.
- Kanny, G., Moneret-Vautrin, D. A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., &Thevenin, F. (2001) Population study of food allergy in France. *J. Allergy Clin. Immun.* **108**, 133-140.
- 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. Immun.* **86(1)**, 41–44.
- Kiening, M., Niessner, R., Drs, E., Baumgartner, S., Krska, R., Bremer, M., Tomkies, V., Reece, P., Danks, C., Immer, U., Weller, M.G., (2005) Sandwich immunoassays for the determination of peanut and hazelnut traces in foods. *J. Agric. Food Chem.* **53(9)**,3321–3327.

- Koppelman, S. J., Vlooswijk, R. A. A., Knippels, L. M. J., Hessing, M., Knol, E. F., van Reijssen, F. C., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M. (2001) Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia and Valencia, bred in different part of the world. *Allergy* **56**, 132–137.
- Koppelman, S. J., Bleeker-Marcelis, H., Duijn, G., Hessing, M. (1996) Detecting peanut allergens: the development of an immunochemical assay for peanut proteins. *World of Ingredients*, **7195**, 35–8.
- Koppelman, S. J., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Hessing, M., Jongh, H. H. (1999) Heatinduced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J. Biol. Chem.* **274**, 4770–4777.
- Koppelman, S. J., Knol, E.F., Vlooswijk, R.A.A., Wensing, M., Knulst, A.C., Hefle, S., Gruppen, H., Piersma, S. (2003) Peanut allergen Ara h 3:isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy* **58**, 1144–1151.
- Koppelman, S. J., Wensing, M., Ertmann, M., Knulst, A.C., Knol, E.F. (2004) Relevance of Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h 2 is the most important peanut allergen. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 583–590.
- Koppelman, S., Hefle, S. (2006) *Detecting Allergens in Food*. Woodhead, Cambridge.
- Kris-Etherton, P. M., Hu, F.B., Ros, E., Sabate, J. (2008) The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *J. Nutr.* **38(9)**,1746-1751.
- Krska, R., Welzig, E., Baumgartner, S. (2004) Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. *Anal. Bioanal. Chem.* **378(1)**, 63–65.
- Kukić, S., Markić, B. (2011) Metode, tehnike, postupci i instrumenti znanstvenoistraživačkog rada. *Informatologia* **44**, 159-160.
- Kwon, J., Lee, Y.M. (2012) Exploration of past experiences, attitudes and preventive behaviors of consumers with food allergies about dining out: A focus group study. *Food Prot. Trends* **32(12)**,736-746.

- Lack, G. (2008) Epidemiologic risks for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 1331–1336.
- Lehrer, S. B., Horner, W. E., Reese, G. (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36(6)**, 553–564.
- Lepp, U., Zabel, P., Schocker, F. (2002) Playing cards as a carrier for peanut allergens. *Allergy* **57(9)**, 864.
- Leung, D. Y., Sampson, H. A., Yunginger, J. W., Burks, A. W., Schneider, L. C., Wortel, C. H., Davis, F. M., Hyun, J. D., Shanahan, W. R. (2003) Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N. Engl. J. Med.* **348(11)**, 986–993.
- Levetin, E., McMahon, K. (2008) Legumes. U: Plants and society. 5. izd. The McGraw–Hill Companies, str. 212-213.
- Malecki, S. J., Chung, S. Y., Champagne, E. R., Raufman, J. P. (2000) The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, 763–768.
- Maleki, S. J., Teuber, S. S., Cheng, H., Chen, D., Comstock, S. S., Ruan, S., Schein, C. H. (2011) Computationally predicted IgE epitopes of walnut allergens contribute to cross-reactivity with peanuts. *Allergy*, **66**, 1522-1529.
- Martinis, I (2004) Nutritivna alergija. *Medix* **52**, 86- 88.
- McKay, J. (2007) Food industry and economic development in the Asia Pacific. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **16(1)**, 80-84.
- Mittag, D., Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B.K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W.M., Koppelman, S., 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**, 1410–1417.
- Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M.F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R. M., Wal, J. M., Bernard, H. (2005) Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *J. Agric. Food. Chem.* **53(11)**, 4547–4553.

Morisset, M., Moneret-Vautrin, D. A., Kanny, G., Guenard, L., Beaudouin, E., Flabbee, J., Hatahet, R. (2003) Thresholds of clinical reactivity to milk, peanut, and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 1046–1051.

Muraro, A., Hoffmann-Sommergruber, K., Holzhauser, T., Poulsen, L. K., Gowland, M. H., Akdis, C. A., Mills, E. N., Papadopoulos, N., Roberts, G., Schnadt, S., van Ree, R., Sheikh, A. S. (2014) EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs. *Allergy* **69(11)**:1570.

Noimark, L., Gardner, J., Warner, J.O. (2009) Parents' attitudes when purchasing products for children with nut allergy: a UK perspective. *Pediatr. Allergy Immun.* **20**, 500–504.

Pele, M., Broh'ee, M., Anklam, E., Van Hengel, A.J. (2007) Peanut and hazelnut traces in cookies and chocolates: relationship between analytical results and declaration of food allergens on product labels. *Food Addit. Contam.*, **24**, 1334–1344.

Peng, J., Meng, X., Deng, X., Zhu, J., Kuang, H., Xu, C (2014) Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of ovalbumin in foods. *Food Agric. Immunol.* **25**,1–8.

Pieretti, M. M., Chung, D., Pacenza, R., Slotkin, T., Sicherer, S. H. (2009) Audit of manufactured products: use of allergen advisory labels and identification of labeling ambiguities. *J. Allergy Clin. Immun.* **124(2)**,337-341.

Poms, R. E., Capelletti, C., Anklam, E. (2002) Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. *Mol. Nutr. Food Res.* **48**, 459–464.

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

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

Pravilnik o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane (2011) *Narodne novine* **79**, Zagreb.

Randall, M. D., Neil, K. E. (2009) Disease management. London: The Pharmaceutical Press, 217-24.

Sampson, H. A. (2001) Utility of food specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 891-896.

Sampson, H. A. (2002) Clinical practice. Peanut allergy. *N. Engl. J. Med.* **346(17)**, 1294–1299.

Sampson, H. A. (2004) Update on food allergy. *J. Allerg. Clin. Immunol.* **113**, 805-819.

Scurlock, A. M., Burks, A. W. (2004) Peanut allergenicity. *Ann. Allergy Asthma Im.* **93(5)**, 12–18.

Se-young, J., Jong-Hwan, P., Tong-Kyoung, K., Kyu-earn, K. (2015) Attitudes and preferences of consumers toward food allergy labeling practices by diagnosis of food allergies. *Nutr. Res. Pract.* **9(5)**, 517-522.

Sicherer, S. H., Furlong, T. J., Munoz-Furlong, A., Burks, A. W., Sampson, H. A. (2001) A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: characteristics of the first 5149 registrants. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 128-132.

Sicherer, S. H. (2002) Clinical update on peanut allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **88(4)**, 350–61.

Sicherer, S. H., Muñoz-Furlong, A., Sampson, H. A. (2003) Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: A 5-year follow-up study. *J. Allerg. Clin. Immunol.* **112**, 1203-1207.

Skripak, J. M., Matsui, E. C., Mudd, K., Wood, R. A. (2007) The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120(11)**, 72–77.

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

Thomas, L., Mills, J.E. (2006) Consumer knowledge and expectations of restaurant menus and their governing legislation: a qualitative assessment. *J. Foodservice* **17**, 6–22.

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

- Wen, H. W., Borejsza-Wysocki, W., DeCory, T. R., Durst, R. A. (2007) Peanut allergy, peanut allergens, and methods for detection of peanut contamination in food products. *Compr. Rev. Food Sci. Technol.* **6**, 47-58.
- Wensing, M., Penninks, A.H., Hefle, S.L., Koppelman, S.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Knulst, A.C. (2002) The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immun.* **110(6)**, 915-920.
- Whitaker, T. B., Williams, K. M., Trucksess, M. W., Slate, A. B. (2005) Immunochemical analytical methods for the determination of peanut proteins in foods. *J. AOAC Int.* **88(1)**, 161–174.
- Young, M. C. (2015) Taking the leap earlier: the timing of tolerance. *Curr. Opin. Pediatr.* **27**, 736–740
- 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(6)**, 1334–1342.
- Yunginger, J.W., Gauerke, M.B., Jones, R.T., Dahlberg, M.E., Ackerman, S.J. (1983) Use of radioimmunoassay to determine the nature, quantity and source of allergenic contamination of sunflower butter. *J. Food Prot.* **46**, 625–628.
- Zeiger, R. S. (2003) Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics* **111(6)**, 1662–1671.
- Zhou, S. (2007) Food labeling status of foreign countries. *World Agr.* **6**, 67-68.
- Zurzolo, G. A., Koplin, J. J., Mathai, M. L., Tang, M. K., Allen, K. J. (2013) Perceptions of precautionary labelling among parents of children with food allergy and anaphylaxis. *Med. J.* **198**, 621–623.

7. PRILOZI

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 podatke i istražiti o znanju u vezi kikirikija i proizvoda 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) Selo
- b) Grad

2. Alergije

2.1. Alergija je:

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

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

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

