

Imunoenzimska metoda u određivanju alergena mlijeka

Horvatović, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:695954>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Matea Horvatović

7218/N

IMUNOENZIMSKA METODA U ODREĐIVANJU ALERGENA
MLIJEKA
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitika hrane

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Marković

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kontrolu kvalitete u prehrambenoj industriji

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Imunoenzimska metoda u određivanju alergena mlijeka

Matea Horvatović, 0058208567

Sažetak:

Imunoenzimska ELISA (engl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metoda jednostavna je i brza metoda kojom se određuje prisutnost i količina antigena. Budući da se radi o vrlo specifičnoj reakciji antigen-antitijelo, u ovome radu korištena je u cilju određivanja alergena mlijeka u osam uzoraka keksa i čajnih peciva, od čega u četiri uzorka iz trgovačkih lanaca te četiri uzorka iz pekarnica sa zagrebačkog područja. U uzorcima keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca nisu detektirani alergeni mlijeka, dok se udio alergena mlijeka određen u tri od četiri analizirana uzorka iz pekarnica kretao u rasponu od $0,24 \text{ mgkg}^{-1}$ do $0,32 \text{ mgkg}^{-1}$. Rezultati imunoenzimskih analiza također su uspoređeni s informacijama o hrani naznačenim na analiziranim proizvodima. Uočeno je kako dva uzorka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca u okviru informacija o hrani sadrže navod "može sadržavati" vezan uz prisutnost alergena mlijeka, iako alergeni mlijeka imunoenzimskim analizama nisu detektirani, dok jedan od uzoraka iz pekarnica u kojem su detektirani alergeni mlijeka ne sadrži navod o prisutnosti alergena mlijeka.

Ključne riječi: alergeni mlijeka, imunoenzimska metoda, informacija o hrani

Rad sadrži: 27 stranica, 8 slika, 3 tablice, 39 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Marković

Datum obrane: 10. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Immunoenzyme method for milk allergens determination

Matea Horvatović, 0058208567

Abstract: Immunoenzyme ELISA method (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) is a simple and rapid method for detecting and quantitating antigens. Since there is highly specific antigen-antibody reaction, in this study it is used for detecting and quantitating milk allergens in eight samples of biscuits and tea biscuits, four samples from supermarkets and four samples from bakeries on Zagreb market. In samples of biscuits and tea biscuits from supermarkets milk allergens were not detected, while milk allergens were determined in three of four samples from bakeries in the range from 0,24 mgkg⁻¹ to 0,32 mgkg⁻¹. The results of immunoenzyme analysis were compared with food labels that were provided on products used in this research. It was noticed that two samples of biscuits and tea biscuits from supermarkets have statement „may contain traces of milk products“ on their food labels, but milk allergens were not detected with immunoenzyme analysis, while one of the samples from bakeries in which milk allergens were detected didn't provide any information of the presence of milk allergens.

Keywords: food information, immunoenzyme method, milk allergens

Thesis contains: 27 pages, 8 figures, 3 tables, 39 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Ksenija Marković, Full professor

Defence date: 10 September 2018

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. Alergija na hranu..... | 2 |
| 2.1.1. Alergijska reakcija na mlijeko | 5 |
| 2.2. ELISA metoda | 8 |
| 2.2.1. Vrste ELISA testova | 9 |
| 2.2.2. Određivanje alergena mlijeka ELISA metodom | 10 |
| 2.3. Označavanje alergena..... | 10 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 13 |
| 3.1. Materijal | 13 |
| 3.1.1. Uzorci | 13 |
| 3.1.2. Reagensi..... | 13 |
| 3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor | 14 |
| 3.2. Metode rada | 16 |
| 3.2.1. Priprema reakcijskih otopina | 16 |
| 3.2.2. Priprema uzoraka – ekstrakcija | 16 |
| 3.2.3. Analiza uzoraka ELISA testom | 16 |
| 3.2.3.1. Princip ELISA testa | 16 |
| 3.2.3.2. Postupak određivanja | 17 |
| 3.2.4. Obrada podataka | 19 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 19 |
| 5. ZAKLJUČAK | 23 |
| 6. LITERATURA | 24 |

1. UVOD

Alergija je prejakna reakcija imunološkog sustava na uobičajeno neopasne tvari. Može ih imati svatko, bez obzira na dob, iako su češće kod osoba koje imaju alergijske bolesti u obitelji. Uobičajeni alergeni su različite tvari iz okoliša ili hrane, a najčešći su oni koji u tijelo ulaze putem dišnog sustava (npr. pelud, plijesan), a rjeđi su oni iz lijekova i hrane (HZJZ, 2018).

Kada govorimo o alergijama na hranu, kliničke manifestacije mogu obuhvatiti znakove i simptome od strane svih organa i organskih sustava. Nutritivne alergije predstavljaju sve veći javno-zdravstveni problem i rezultat su složenih imunoloških zbivanja. Tako na primjer gastrointestinalna sluznica predstavlja ulazna vrata, ali i barijeru za antigene koji se unose hranom (Šadić i Maltez Ćatić, 2013). Prevalencija je u značajnom porastu posebno u razvijenim zemljama zapada, a možemo reći kako je incidencija veća kod djece (5-8%), nego kod odraslih (1-3%). U dijagnostici je iznimno važna dobro uzeta anamneza, a liječenje se pretežno svodi na eliminacijsku dijetu tako da alergije smanjuju i kvalitetu života oboljelih (Turkalj i Mrkić, 2012).

Alergija na mlijeko je imunološka reakcija na proteine mlijeka koja se najčešće javlja u prvim godinama života, odnosno kod djece. U mlijeku ima oko 40 proteina koji se mogu ponašati kao antigeni (80% proteina mlijeka čini kazein, a 10% proteini sirutke, većinom β -laktoglobulin). Simptomi koji se pojavljuju variraju od povraćanja, dijareje, grčeva, gastrointestinalnih simptoma, do atopijskog dermatitisa i anafilaktičkog šoka. Kao i za ostale alergije na hranu, liječenje uključuje eliminacijsku dijetu. Međutim, oko 80% djece alergiju na mlijeko preraste do svoje adolescencije (Odedra, 2015).

Imunoenzimskim ELISA testom često se određuje prisutnost i količina alergena u hrani te će ta metoda biti korištena u ovom radu u cilju određivanja udjela potencijalnih alergena mlijeka u osam uzoraka keksa i čajnih peciva, od čega u četiri uzorka iz trgovačkih lanaca te četiri uzorka iz pekarnica, a rezultati analiza također će biti uspoređeni s informacijama o hrani naznačenim na analiziranim proizvodima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Alergija na hranu

Alergija na hranu je hipersenzitivna reakcija koja nastaje kao imunološki odgovor na prisutnost nekih komponenata hrane, najčešće proteina. Broj oboljelih raste iz godine u godinu, a češći je u razvijenim zemljama. Prevalencija ovisi o prehrani, okolišnim čimbenicima, ali također i o njihovoj interakciji s genima. EFA (*European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients' Associations*, Europska federacija udruge pacijenata bolesti dišnih putova i alergija) izvještava kako otprilike 8% djece i 4% odraslih osoba ima neki oblik alergije na hranu (Barros i Cosme, 2013).

Mehanizam imunoloških reakcija može biti IgE zavisan ili IgE nezavisan. IgE zavisne nutritivne alergije dijele se na one s naglim nastankom (urtikarija, anafilaktički šok, astma, angioedem, gastrointestinalna alergija), a pojavljuju se ubrzo nakon uzimanja hrane te sindrome koji imaju rani i odloženi nastanak (npr. ekcem). IgE nezavisna nutritivna alergija podrazumijeva imunokompleksni i kasni tip preosjetljivosti na antigene hrane koji se pojavljuje kod odraslih (upalna bolest crijeva, gastritis) te citotoksični tip reakcija koji je rijedak (npr. trombocitopenija izazvana limunskom kiselinom). Tipičan predstavnik IgE nezavisne nutritivne alergije je celijakija (Šadić i Maltez Ćatić, 2013).

Alergijska reakcija na hranu javlja se zbog poremećenog imunološkog odgovora u sluznici probavnog sustava. Ona čini fizikalno-kemijsku (sluz, enzimi, pH, epitelne stanice) i staničnu (NK stanice, makrofagi, polimorfonukleari) barijeru te tako sprječava ulazak patogena i intaktnih antigena. Nezrelost sluzničke barijere (npr. nezrelost sekretornih IgA) vjerojatno predisponira za povećanu prevalenciju infekcija i alergijskih reakcija u prvim godinama života (Turkalj i Mrkić, 2012).

EFSA (*European Food Safety Authority*) razmatra sve prehrambene proizvode i tvari koje mogu izazvati alergije, a čija prisutnost u hrani, u skladu sa zakonodavstvom EU, mora biti označena na proizvodu. To su žitarice koje sadrže gluten, zatim mlijeko, jaja, orasi, kikiriki, soja, riba, rakovi, mekušci, celer, lupina, sezam, gorušica i sulfiti (HAH, 2014).

Simptomi alergija na hranu ovise o alergenima, mehanizmu alergijskih reakcija i starosti bolesnika. Mala djeca najčešće imaju atopični dermatitis i/ili gastrointestinalne simptome (povraćanje, dijareja, mučnina) te najčešće prerastu ove simptome. Ona sve više reagiraju na inhalacijske alergene simptomima astme i rinitisa (tzv. atopijski marš). Bolesnici u dobi od 10 godina rijetko imaju respiratorne simptome nakon konzumacije hrane koja je ranije izazivala alergiju, ali kožni test ostaje pozitivan (Ivančević, 2010).

Starija djeca i odrasli koji ostaju alergični na hranu kasnije imaju teže reakcije (npr. eksplozivna urtikarija, angioedem, čak i anafilaksija). Kod manjeg broja bolesnika hrana (npr. žitarice i celer) izaziva anafilaksiju jedino ako se nakon konzumiranja hrane odmah bave tjelesnom aktivnošću (mehanizam nastanka = nepoznat). Također, manji broj bolesnika ima migrenu koja se javlja ili pogoršava nakon konzumiranja određene hrane (Ivančević, 2010).

Simptomi mogu zahvatiti gastrointestinalni, kožni, kardiovaskularni i respiratorni sustav. Anafilaksija je najopasnija alergijska reakcija koja može biti i smrtonosna. Alergije na hranu uključuju imunološki sustav, a možemo ih podijeliti u 3 skupine: IgE posredovane, IgE neposredovane alergijske reakcije i miješane IgE posredovane i IgE neposredovane (Sharma i sur., 2015).

Kod IgE posredovanih alergijskih reakcija na hranu simptomi se razvijaju brzo, to uključuje minute do 2 sata nakon uzimanja hrane na koju je osoba alergična. Jedina poznata IgE posredovana alergijska reakcija kod koje se simptomi javljaju kasnije, 4 do 6 sati nakon unosa hrane, je ona na meso sisavaca (osobito svinjetina, janjetina i govedina). Simptomi kod ovih alergijskih reakcija mogu obuhvatiti nekoliko organskih sustava, uključuju urtikariju i angioedem, rinokonjuktivitis, respiratorne, gastrointestinalne i kardiovaskularne probleme (Sharma i sur., 2015).

Urtikarija je pojava osipa na koži, mrlja koje često nestaju i pojavljuju se na drugom dijelu tijela. Ne samo oralni unos, nego i direktni kontakt s hranom na koju je osoba alergična, može izazvati urtikariju. Ako urtikarija traje dulje od 6 tjedana, onda se vjerojatno ne radi o alergijskoj reakciji na hranu. Angioedem uključuje oticanje kože, javlja se povremeno i u nepravilnim razmacima, a može zahvatiti lice, gornje i donje ekstremitete i gornji dišni sustav. Među hranom koja najčešće uzrokuje angioedem kod alergičnih osoba je i kravlje mlijeko. Oralni alergijski sindrom je alergijska reakcija na hranu kada unos svježeg voća i povrća uzrokuje svrbež, trnce u ždrijelu i/ili blago otečena usta, jezik, nepce i grlo. Kod oko 1 do 2% pacijenata može dovesti do anafilaksije. Kada govorimo o rinokonjuktivitisu, onda je to upalna bolest sluznice nosa i oka (Sharma i sur., 2015).

Gastrointestinalne simptome možemo podijeliti na one koji obuhvaćaju gornji gastrointestinalni sustav (mučnina, povraćanje, i/ili abdominalna bol koja se pojavljuje nekoliko minuta do 2 sata nakon ingestije) i one koji obuhvaćaju donji gastrointestinalni sustav (grčevi i dijareja koji se pojavljuju 2 do 6 sati nakon ingestije) (Sharma i sur., 2015).

Anafilaksija uzrokovana hranom je najozbiljnija komplikacija IgE posredovanih alergijskih reakcija, zahvaća 2% populacije. Neki od rizičnih čimbenika koji povećavaju rizik od smrtnog ishoda su: mlađa životna dob, istovremena astma, te reakcija na kikiriki. Većini smrtnih ishoda prethode ranije reakcije, ali one su rijetko ozbiljne. To upućuje na nepredvidljivost simptoma alergija na hranu jer ozbiljnost ranijih reakcija ne predviđa konačni ishod i ozbiljnost budućih reakcija. 90% pacijenata koji dožive anafilaksiju imaju urtikariju/angioedem i/ili rinokonjuktivitis, ostali najčešće uključeni organski sustavi su respiratorni, gastrointestinalni i kardiovaskularni sustav. U usporedbi s odraslima, djeca razvijaju rjeđe kardiovaskularne, a češće respiratorne simptome. Tako je fatalni ishod uzrokovan kardiovaskularnim simptomima najčešći kod odraslih, a respiratornim simptomima kod djece. Kada govorimo o gastrointestinalnim simptomima u anafilaksiji pojavljuju se u 45% slučajeva anafilaksije i najčešći su kod anafilaksije uzrokovane hranom. Oni mogu dovesti do dehidracije i neravnoteže elektrolita, pogotovo kod novorođenčadi i djece (Sharma i sur., 2015).

IgE neposredovane alergije na hranu uzrokuju odgođene i kronične simptome, a uključuju alergijski proktokolitis uzrokovan proteinima hrane, enterokolitički sindrom uzrokovan proteinima hrane, celijakiju i hemosideroza pluća (Sharma i sur., 2015).

Proktokolitis uzrokovan proteinima hrane često se pojavljuje kod dojenčadi od 2 do 8 tjedana. Mogu se pojaviti sluz i krv u stolici te povećana pokretljivost crijeva. Enterokolitički sindrom obično se javlja kod djece mlađe od 9 mjeseci koji su hranjeni kravljim mlijekom ili formulama na bazi soje. Od simptoma javljaju se obilno, ponavljano povraćanje i dijareja koji vode do dehidracije i letargije te može doći i do slabijeg rasta, anemije i hipoproteinemije. Celijakija također dovodi do povraćanja i dijareje kod dugoročnog uzimanja hrane koja sadrži gluten te može doći do upale sluznice gastrointestinalnog sustava te atrofije sitnih resica, vila. Od simptoma još se pojavljuju i nadutost, steatoreja te se može pojaviti malasporcija. Kada se iz prehrane izbací hrana koja sadrži gluten, simptomi nestaju nakon nekoliko tjedana do mjeseci. Hemosideroza pluća je najčešće rezultat ingestije proteina kravljeg mlijeka. Najčešće se javlja kod djece od 4 do 29 mjeseci starosti te može

dovesti do nemogućnosti napredovanja (razvoja) djeteta te anemije uzrokovane manjkom željeza (Sharma i sur., 2015).

Miješane IgE posredovane i IgE neposredovane alergije na hranu uključuju eozinofilni ezofagitis i eozinofilni gastroenteritis te atopijski dermatitis. Simptomi kod eozinofilnog ezofagitisa ovise od dobi kada se pojavljuju. Kod dojenčadi i djece javlja se nemogućnost napredovanja, a kod starije djece i odraslih javljaju se povraćanje, abdominalna bol i disfagija. Eozinofilni gastroenterokolitis obuhvaća simptome poput abdominalne boli, dijareje, malapsorpcije, mučnine i gubitka težine. Dijeta koja uključuje izbacivanje hrane ovdje nema učinka. Kod djece koja imaju atopijski dermatitis javlja se osip, suha i ispućala koža, te može nastati ekcem. Mlijeko također pripada skupini namirnica koje ga najčešće uzrokuju (Sharma i sur., 2015).

2.1.1. Alergijska reakcija na mlijeko

Alergija na mlijeko je imunološki odgovor na proteine mlijeka različitih sisavaca, a pojavljuje se uglavnom kod djece. Može se podijeliti na IgE posredovane, IgE neposredovane i miješane, a one se razlikuju u simptomima, dijagnostici i prognozi bolesti. Mlijeko različitih sisavaca, kao i ljudsko mlijeko, sadrži slične proteine kada govorimo o njihovoj funkciji, strukturi i biološkim značajkama te se sastav mijenja ovisno o laktaciji. Međutim, proteini unutar samog npr. kravljeg mlijeka su heterogeni i razlikuju se funkcijom i strukturom. Kravlje mlijeko sadrži oko 30 do 35 g proteina po litri, odnosno govorimo o kazeinu i proteinima sirutke. Čini se da su svi proteini kravljeg mlijeka potencijalno alergeni. Možemo reći kako je alergija na kravlje mlijeko najčešća alergija na mlijeko (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2014).

Alergija na kravlje mlijeko se može pojaviti kod novorođenčadi i većinom nestaje tijekom prve godine života. Dojenje pruža zaštitu od prodora antigena zbog nezrelosti imunološkog sustava u prvim mjesecima života. Ako to nije slučaj, lako se prekida obrambena sluznička barijera te crijevo postaje propusnije i stvaraju se uvjeti za razvoj alergije. Djeca na proteine kravljeg mlijeka, koji su za dijete strana bjelančevina, mogu stvoriti toleranciju i oni će postati prehrambeno iskoristivi, međutim to ne mora biti slučaj (Jurčić i Oberiter, 1996). Možemo reći kako je incidencija alergije na kravlje mlijeko značajno niža kod dojene djece u odnosu na djecu na umjetnoj prehrani (Vandenplas i sur., 2007).

Danska kohortna studija je izvijestila kako je čak 56% djece preraslo alergiju na kravlje mlijeko tijekom prve godine života (Høst i Halcken, 1990), dok neke druge, novije studije (Elizur i sur., 2012) upućuju na to kako alergija na kravlje mlijeko traje dulje. Međutim, većina studija upućuju na to kako se alergija na mlijeko preraste do 3. ili 4. godine. Osobe s alergijom na kravlje mlijeko imaju gastrointestinalne simptome u 32 do 60% slučajeva, kožne simptome u 5 do 90%, a anafilaksija se pojavljuje u 0,8 do 9% slučajeva. Slučajevi anafilaksije su glavna tema i briga većine istraživanja o alergijama na mlijeko. Ova alergija je bila uzrok hospitalizacije 42% djece zbog anafilaksije uzrokovane hranom (Berni Canani i sur., 2012) te čak 13% smrtnih ishoda anafilaksije uzrokovane hranom (Bock i sur., 2007).

Kada govorimo o proteinima kravljeg mlijeka, govorimo o kazeinu i proteinima sirutke. Proteini sirutke uključuju *alfa*-laktalbumin, *beta*-laktoglobulin, BSA (bovin serum albumin) i laktoferin (tablica 1). Različita istraživanja pokazuju da od 0 do 80% pacijenata reagira na *alfa*-laktalbumin (Besler i sur., 2002), ali ta tema je dosta kontroverzna. *Beta*-laktoglobulin je najzastupljeniji od proteina sirutke, a prevalencija alergija na ovaj protein iznosi od 13 do 76% (Restani i sur., 2009). Studije pokazuju kako je od 0 do 88% pacijenata osjetljivo na BSA, dok se klinički simptomi pojavljuju kod do 20% pacijenata (Martelli i sur., 2002). Poznato je više grupa proteina koje pripadaju frakciji kazeina, a zajednički im je naziv Bos d 8. Osjetljivost je najčešća na *alfa*-kazein (100%) i *kapa*-kazein (91.7%) (Restani i sur. 1995). Neka istraživanja pokazala su kako je *alfa*-s1-kazein glavni alergen (Ruiter i sur., 2006).

Možemo reći kako mlijeko sadrži oko dvadeset proteinskih antigenskih komponenti, koje pojedinačno ili više njih zajedno mogu izazvati alergiju kod pojedinih osoba. *Alfa*-laktalbumin je najčešći uzrok alergija na mlijeko kod djece, a kod odraslih to je *alfa*-laktoglobulin. Osim proteina, mlijeko sadrži i lipoproteine, koji imaju vrlo mala alergena svojstva, pa osobe s alergijom na mlijeko često mogu bez posljedica konzumirati maslac (Martinis, 2004).

Tablica 1. Alergeni kravljeg mlijeka (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2014)

| Alergen | Naziv | Koncentracija (gL⁻¹) |
|-------------------------|------------------------|--|
| Proteini sirutke | | ~5,0 |
| Bos d 4 | α -laktalbumin | 1 – 1,5 |
| Bos d 5 | β -laktoglobulin | 3 – 4 |
| Bos d 6 | bovin serum albumin | 0,1 – 0,4 |
| Bos d 7 | imunoglobulin | 0,6 – 1,0 |
| Bos d laktoferin | laktoferin | 0,09 |
| Kazein | | ~30 |
| Bos d 8 | | 20 – 30 |
| Bos d 9 | α_{s1} - kazein | 12 – 15 |
| Bos d 10 | α_{s2} -kazein | 3 – 4 |
| Bos d 11 | β -kazein | 9 – 11 |
| NA | γ_1 -kazein | |
| NA | γ_2 -kazein | 1 – 2 |
| NA | γ_3 -kazein | |
| Bos d 12 | κ -kazein | 3 – 4 |

Kada govorimo o procesiranju mlijeka (poput toplinske obrade, tretiranja visokim tlakom, ekstruzije), ti procesi mogu utjecati na strukturu alergena te tako povećati ili smanjiti njihov alergeni potencijal (Maleki i Hurlburt, 2004).

2.2. ELISA metoda

Za izbor analitičke metode u analitici hrane vrlo su važni vrsta uzorka (njegova kemijska i fizikalna svojstva) i cilj, odnosno konačna informacija kao rezultat analize. Razlikujemo „*screening*“ metode i potvrdne službene, propisane metode. „*Screening*“ metode ne omogućuju definitivan rezultat, ali mogu nam reći je li analit ili više njih prisutan u uzorku iznad određene razine (Runje i Cvrtila, 2006).

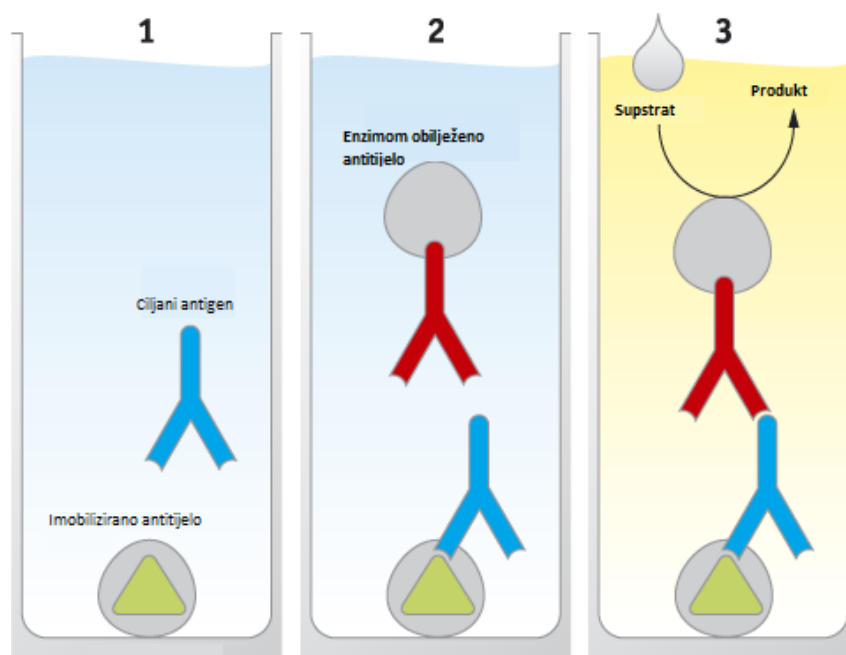
Jedna od „*screening*“ metoda je i ELISA metoda, a Hrvatska agencija za hranu navodi kako se kod npr. dokazivanja uzročnika u hrani ELISA koristi kao orijentacijska metoda, koja daje rezultate i unutar 26 sati (Marinculić i sur., 2009).

ELISA test se često koristi i za određivanje prisutnosti i količine antigena. Navedena metoda se temelji na reakciji vezanja antitijela i antigena iz uzorka te zatim slijedi spektrofotometrijsko mjerenje, zahvaljujući promjeni boje (Butorac, 2013). Odnosno, dolazi do promjene boje supstrata što ga enzim razgrađuje. Postupak je vrlo osjetljiv, daje brze i pouzdane rezultate, a i utrošak antigena i protutijela je malen (Sino Biological Inc., 2018).

Nakon otkrića da se topljivi antigen ili protutijela mogu vezati za čvrstu podlogu, a da se ne isperu puferiranom fiziološkom otopinom, došlo je do uvođenja ELISA-e (Runje i Cvrtila, 2006). Koristi se kod određivanja alergena u hrani poput mlijeka, lješnjaka, kikirikija i jaja, ali i kod kontaminacije mikroorganizmima, antibioticima i pesticidima (Chen i sur., 2012). Međutim, svaka metoda ima nedostatke, pa tako i ova, jedan od nedostataka svakako je što se ne može koristiti za toplinski obrađene uzorke hrane jer može doći do denaturacije proteina (Sino Biological Inc., 2018).

2.2.1. Vrste ELISA testova

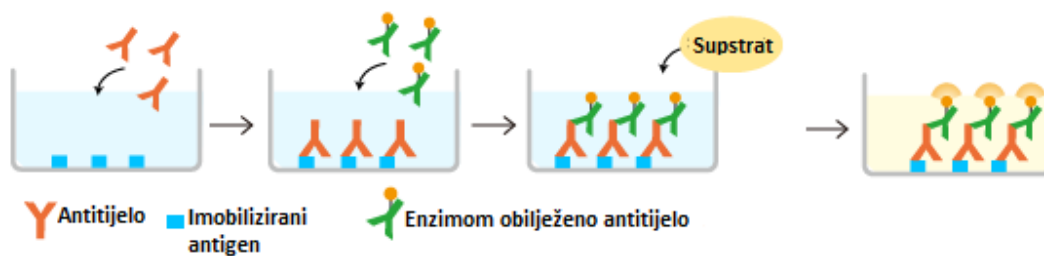
Direktna ili „sandvič“ ELISA (slika 1) podrazumijeva često imobilizaciju antitijela za dno mikrotitarske ploče. Zatim se dodaje otopina standarda ili otopina uzorka te nastaje antitijelo-antigen veza, ukoliko je antigen prisutan u uzorku. Slijedi dodavanje drugog antitijela, koje je specifično za ispitivani antigen koje se također veže za analit, te nastaje takozvani „sandvič“. Dodaje se supstrat, koji reagira s enzimom i dolazi do obojenja. Za ovu vrstu ELISA testa karakteristično je da je apsorbancija direktno proporcionalna koncentraciji analita (Besler i sur., 2002).



Slika 1. „Sandvič“ ELISA (Wieslab, 2018)

Konkurentna ili kompetitivna ELISA (slika 2) podrazumijeva često imobilizaciju antigena za čvrstu fazu. Zatim se u jažicu dodaje određena količina primarnog antitijela i slobodnog antigena (iz uzorka). Javlja se kompeticija između imobiliziranog antigena i slobodnog antigena za vezanje s antitijelom. Prednost ima slobodni antigen jer prvi dolazi u kontakt s antitijelom. Slijedi korak ispiranja pri kojem se uklanja nevezani antigen te se dodaje antitijelo obilježeno enzimom koje se veže za kompleks antitijelo-antigen (Besler i sur., 2002).

Ukoliko antigen nije prisutan u uzorku, antitijelo označeno enzimom pokazuje maksimalni afinitet prema antigenu koji je vezan za čvrstu fazu (visoka apsorbancija obojenog produkta). Vezanje antitijela označenog enzimom inhibirano je pri visokim koncentracijama antigena rezultirajući nižim vrijednostima apsorbancije, što je karakteristika ove vrste ELISA testa (Besler i sur., 2002).



Slika 2. Konkurentna ELISA (MBL, 2017)

2.2.2. Određivanje alergena mlijeka ELISA metodom

Postoje brojni ELISA kitovi za određivanje alergena mlijeka s osjetljivošću do 1 mgkg^{-1} (Poms i sur., 2004). Većina test kitova baziraju se na kompetitivnoj ELISA metodi i detekciji kazeina, BSA (bovin serum albumin), *beta*-laktoglobulina ili proteina sirutke uz LOD između 0,1 i 5 mgkg^{-1} (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2014).

U fermentiranim mliječnim proizvodima linearni epitopi mogu biti hidrolizirani, ali zadržavaju alergeni potencijal. Epitopi otpušteni od „roditeljskih“ proteina mogu ostati nedetektirani kod uobičajeno korištenog „sendvič“ ELISA testa (de Luis i sur., 2007). U sličnim uvjetima, kompetitivna ELISA može biti uspješna u detektiranju čak 5 mgkg^{-1} „skrivenih“ peptida u kompleksnim prehrambenim proizvodima (Monaci i sur., 2006).

2.3. Označavanje alergena

Deklaracija ili informacija o hrani je jako bitna za potrošača jer tu nalazi informacije o sastavu hrane te potencijalnim alergenima, a omogućuje mu da odabere hranu prema svojim potrebama.

To se odnosi na zapakiranu i nezapakiranu hranu, hranu iz automata i hranu koja se nudi krajnjem potrošaču (bolnica, dječji vrtić, škola, catering i sl.). Budući da je potrebno osigurati visoku razinu zaštite potrošača, potrebno je osigurati primjereno informiranje u vezi s hranom koju konzumiraju.

„Kada se koriste u proizvodnji hrane i prisutni su u toj hrani, određeni sastojci ili druge tvari ili proizvodi (kao što su pomoćne tvari u procesu proizvodnje) koji mogu uzrokovati alergije ili netolerancije kod nekih osoba, a neke od tih alergija ili netolerancija predstavljaju opasnost za zdravlje potrošača. Važno je navesti informacije o prisutnosti prehrambenih aditiva, pomoćnih tvari u procesu proizvodnje i drugih tvari ili proizvoda za koje je znanstveno dokazano da uzrokuju alergije ili netolerancije kako bi se omogućilo potrošačima, posebno onima koji pate od alergije ili netolerancije na hranu, da budu informirani kako bi donijeli odluke koje su sigurne za njih“ (Uredba EU, 2011).

Kao tvari ili proizvodi koji uzrokuju alergije i netolerancije navode se:

- žitarice koje sadrže gluten, tj. pšenica, raž, ječam, zob, pir, kamut ili njihovi križanci, te proizvodi od tih žitarica;
- rakovi i proizvodi od rakova;
- jaja i proizvodi od jaja;
- riba i riblji proizvodi;
- kikiriki i proizvodi od kikirikija;
- zrna soje i proizvodi od soje;
- mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući laktozu), osim: sirutke koja se upotrebljava za proizvodnju alkoholnih destilata (uključujući etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla) i laktitola;
- orašasto voće, tj. bademi, lješnjaci, orasi, indijski oraščići, pekan orasi, brazilski orasi, pistacije, makadamije ili kvinslandski orasi te njihovi proizvodi;
- celer i njegovi proizvodi;

- gorušica i proizvodi od gorušice;
- sjeme sezama i proizvodi od sjemena sezama;
- sumporni dioksid i sulfiti pri koncentracijama većim od 10 mg/kg ili 10 mg/L računati kao ukupni SO₂;
- lupina i proizvodi od lupine;
- mekušci i proizvodi od mekušaca (Uredba EU, 2011).

Navedene tvari ili proizvodi moraju biti navedeni u popisu sastojaka, a naziv treba biti naglašen uporabom vrste pisma koje se jasno razlikuje od vrste pisma kojim je pisan ostatak popisa sastojaka, na primjer različitim slovima, stilovima ili bojama u pozadini. Ako nema popisa sastojaka, navod podataka mora uključivati riječ „sadrži” iza koje se navodi naziv navedenih tvari ili proizvoda. Ako nekoliko sastojaka ili pomoćnih tvari u procesu proizvodnje hrane potječu od jedne tvari ili proizvoda, to je potrebno jasno navesti za svaki sastojak ili pomoćnu tvar u postupku proizvodnje. Podatke nije potrebno navesti ako naziv hrane jasno upućuje na tu tvar ili proizvod (Uredba EU, 2011).

Kada se govori o nepretpakiranoj hrani, subjekti u poslovanju s hranom obvezni su dati informacije o prisutnosti sastojaka ili pomoćnih tvari u procesu proizvodnje koji uzrokuju alergije ili netolerancije, a navedeni su ili su dobiveni od navedenih tvari ili proizvoda, a koji su upotrijebljeni u procesu proizvodnje ili pripreme hrane i prisutni su u gotovom proizvodu, čak i u promijenjenom obliku. Informacije, iznimno, ne moraju biti pružene krajnjem potrošaču ako su posebne prehrambene potrebe potrošača povezane s tvarima ili proizvodima koji uzrokuju alergije ili netolerancije zabilježene unaprijed, a ponuđena hrana / obroci prilagođeni potrošačevim potrebama (ako se radi o bolnicama, domovima za starije i nemoćne osobe, jaslicama i dječjim vrtićima, kantinama itd.) (Pravilnik, 2014).

Za hranu ponuđenu na prodaju krajnjem potrošaču ili objektima javne prehrane u nepretpakiranom obliku, ili hranu koja se pakira na prodajnom mjestu na zahtjev potrošača, ili je pretpakirana za izravnu prodaju, obvezno je navođenje tvari, svih sastojaka, pomoćnih tvari koje izazivaju alergiju ili netolerancije (Uredba EU, 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja analizirano je osam uzoraka keksa i čajnih peciva, pri čemu četiri uzorka iz trgovačkih lanaca i četiri uzorka iz pekarnica prikupljenih na području Zagreba. Uzorci su označeni sljedećim oznakama: KT1, KT2, KT3, KT4 za uzorke iz trgovačkih lanaca te KP1, KP2, KP3, KP4 za uzorke iz pekarnica.

3.1.2. Reagensi

- AgraQuant, Milk Enzyme Conjugate, Romer Labs (zeleni poklopac, konjugat) (Slika 3)
- AgraQuant Substrate, Romer Labs (plavi poklopac, supstrat) (Slika 3)
- AgraQuant Stop Solution, Romer Labs (crveni poklopac, stop-otopina) (Slika 3)
- AgraQuant, Concentrated Extraction Solution (koncentrirana ekstrakcijska otopina)
- AgraQuant, Concentrated Wash Buffer (koncentrirana otopina za ispiranje)
- Filtrat uzorka.



Slika 3. Reagensi iz seta za ELISA test

3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor

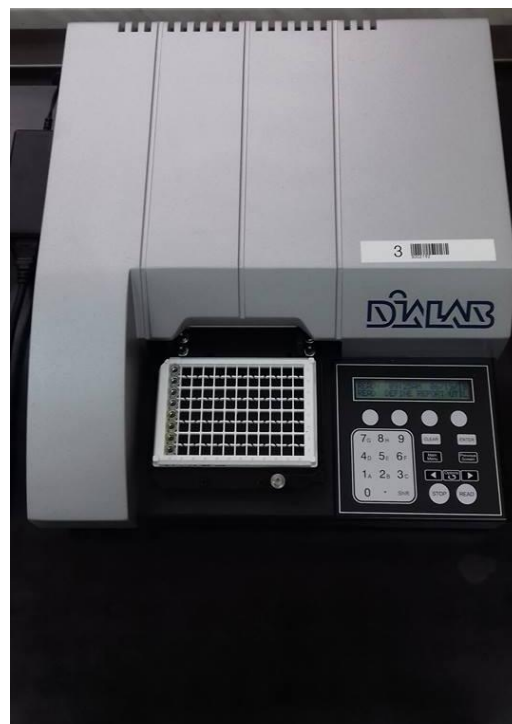
- ručni mlin za usitnjavanje
- odmjerne tikvice od 50 mL i 10 mL
- pipeta od 10 mL
- nastavak za pipetu
- automatska jednokanalna pipeta
- laboratorijska čaša
- staničevina
- Falcon epruvete
- stalak za epruvete
- termometar
- metalna žlica
- stakleni lijevak
- filter papir
- škare
- mikrotitarska ploča, AgraQuant, Romer Labs, Austrija
- vodena kupelj (INKO, Zagreb)
- vortex (VWR, tip VV3)
- orbitalna i linearna tresilica (Slika 4)
- analitička vaga
- centrifuga (Rotofix 32A, Hettich, Njemačka) (Slika 5)
- ELISA-čitač s filterom od 450 nm sa računalnim programom Gen 5, Bio Tek Instruments, SAD (Slika 6).



Slika 4. Tresilica



Slika 5. Centrifuga



Slika 6. ELISA čitač

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema reakcijskih otopina

Pripremljene su otopina pufera za ispiranje i otopina ekstrakcijskog pufera. Otopina ekstrakcijskog pufera pripremljena je na način da je koncentrirana ekstrakcijska otopina iz seta za ELISA test razrijeđena u omjeru 1:5 (ekstrakcijska otopina : destilirana voda) u odmjerne tikvici od 50 mL. Dobivena otopina je u vodenoj kupelji zagrijana na 60°C te zatim ohlađena na sobnu temperaturu. Za pripremu pufera za ispiranje, koncentrirana otopina za ispiranje iz seta za ELISA test razrijeđena je destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 50 mL u omjeru 1:10.

3.2.2. Priprema uzoraka – ekstrakcija

Na analitičkoj vagi izvagano je 0,5 g prethodno usitnjenog i homogeniziranog uzorka, a zatim je dodano 10 mL prethodno pripremljenog, razrijeđenog ekstrakcijskog pufera. Suspenzija je vorteksirana, a potom stavljena na tresilicu (Slika 4) 15 minuta, te je slijedilo centrifugiranje (Slika 5) 10 minuta pri 2000 okretaja kako bi se dobio što bistriji supernatant. Budući da je i dalje bilo vidljivih čestica u supernatantu, provedeno je filtriranje uz pomoć filter papira i lijevka, a talog je odbačen. Filtrat je korišten za daljnje analize.

3.2.3. Analiza uzoraka ELISA testom

3.2.3.1. Princip ELISA testa

AgraQuant Milk test pripada "sandvič" ELISA testu. Pomoću ekstrakcijskog pufera proteini mlijeka su ekstrahirani iz uzorka. Na površini mikrojažica nalaze se primarna antitijela na koja se nakon dodavanja filtrata uzorka (ili standarda) vežu proteini mlijeka, odnosno dolazi do vezanja alergena mlijeka iz uzorka i antitijela. Nakon prve upotrebe pufera za ispiranje (uklanjaju se nevezani antigeni), dodaje se sekundarno antitijelo obilježeno enzimom (konjugat) i slijedi inkubacija.

Nakon druge upotrebe pufera za ispiranje, dodaje se supstrat za enzim i dolazi do razvitka plavog obojenja. Intenzitet obojenja direktno je proporcionalan koncentraciji proteina mlijeka u uzorku (ili standardu). Nakon dodatka stop otopine dolazi do promjene obojenja iz plave u žutu. Slijedi spektrofotometrijsko određivanje intenziteta obojenja pri valnoj duljini od 450 nm. Koristeći prethodno izrađen baždarni dijagram standarda mlijeka, određuje se udio potencijalnih alergena mlijeka u uzorku (mgkg^{-1}).

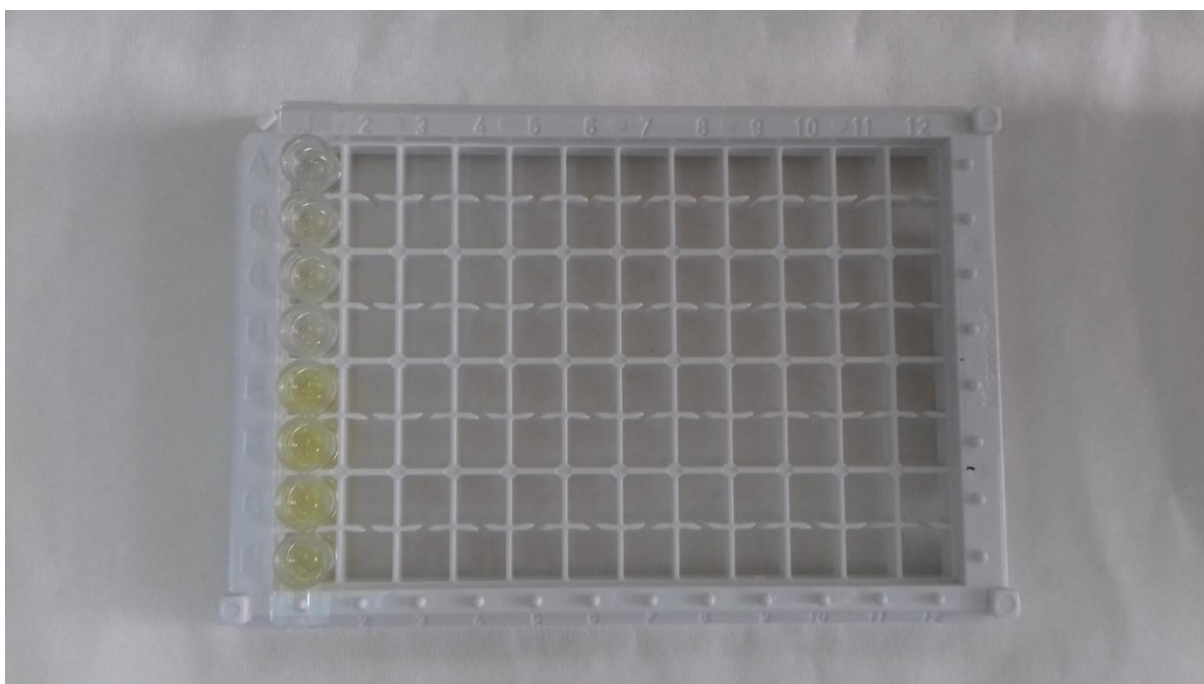
3.2.3.2. Postupak određivanja

Uzet je držač sa setom mikrojažica obloženih antitijelom (Slika 7), u svaku od 8 jažica pomoću jednokanalne automatske pipete dodano je 100 μL pojedinog pripremljenog filtrata uzorka. Korišten je novi nastavak za pipetu za svaki uzorak, a sadržaj je u potpunosti ispražnjen.

Nakon toga, sadržaj je inkubiran pri sobnoj temperaturi 20 minuta. Brzim okretanjem naopako držača za jažice, sadržaj iz mikrojažica odbačen je pažljivo u otpadni spremnik. Slijedilo je ispiranje mikrojažica s pripremljenim puferom za ispiranje, i to 5 puta (nakon svakog postupka ispiranja slijedi pražnjenje mikrojažica u otpadni spremnik). Nekoliko slojeva staničevine korišteno je za sušenje mikrojažica, lupkanjem držača o staničevinu.

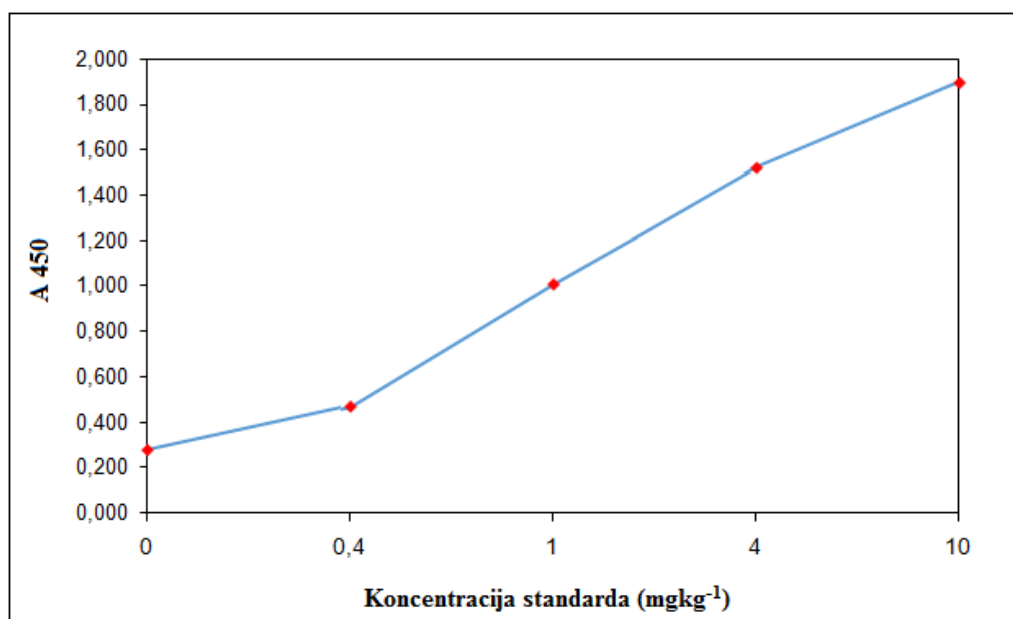
Pomoću jednokanalne automatske pipete dodano je 100 μL konjugata (reagens sa zelenim poklopcem, Slika 3) u svaku jažicu te je potom sadržaj inkubiran pri sobnoj temperaturi 20 minuta. Ponovno je slijedilo pražnjenje mikrojažica u otpadni spremnik (spomenutim postupkom), a zatim ispiranje pripremljenim puferom za ispiranje, 5 puta (nakon svakog postupka ispiranja slijedi pražnjenje mikrojažica u otpadni spremnik) te na kraju sušenje mikrojažica lupkanjem po nekoliko slojeva staničevine.

Pipetirano je 100 μL supstrata (reagens s plavim poklopcem, Slika 3) i inkubirano 20 minuta pri sobnoj temperaturi u tami. Zatim je u svaku jažicu pomoću jednokanalne automatske pipete dodano 100 μL stop otopine (Slika 3), nakon čega je došlo do promjene boje iz plave u žutu. Pomoću čitača s filterom od 450 nm (Slika 6) te računalnog programa očitani su rezultati intenziteta nastalog obojenja. Zabilježene su dobivene vrijednosti apsorbancije za svaki uzorak.



Slika 7. Mikrotitarska ploča

Udio alergena mlijeka u svakom uzorku određen je pomoću prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda mlijeka. Za njegovu izradu korištene su otopine standarda koncentracije 0; 0,4; 1; 4 i 10 mgkg^{-1} (Slika 8).



Slika 8. Baždarni dijagram standarda mlijeka

3.2.4. Obrada podataka

Rezultati su analizirani pomoću računalnog paketa Microsoft Excel Office 2007 programa te su korištene metode deskriptivne statistike (srednja vrijednost, prosječna vrijednost i standardna devijacija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Koristeći imunoenzimski ELISA test, određen je udio potencijalnih alergena mlijeka u osam uzoraka keksa i čajnih peciva, odnosno četiri uzorka iz trgovačkih lanaca na zagrebačkom području koji su označeni oznakama KT1, KT2, KT3 i KT4 te četiri uzorka iz pekarnica sa zagrebačkog tržišta koji su označeni oznakama KP1, KP2, KP3 i KP4. Limit detekcije (LOD) korištenog ELISA testa, odnosno najmanja količina analita koju je danim postupkom moguće odrediti, iznosi $0,05 \text{ mgkg}^{-1}$.

Udio alergena mlijeka izražen je u mgkg^{-1} , a rezultati su prikazani u tablici 2. U svrhu interpretacije rezultata imunoenzimskih analiza sa oznakama na analiziranim proizvodima, u tablici 3 prikazani su navodi na deklaraciji proizvoda korištenih u istraživanju, neposredno vezani uz prisustvo alergena.

Tablica 2. Udio (mgkg^{-1}) alergena mlijeka u uzorcima keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca (KT1, KT2, KT3, KT4) i pekarnica (KP1, KP2, KP3, KP4)

| Uzorak | Udio alergena mlijeka [mgkg^{-1}] (srednja vrijednost \pm SD) |
|-----------------------------|---|
| KT1 | <LOD |
| KT2 | <LOD |
| KT3 | <LOD |
| KT4 | <LOD |
| KP1 | 0,24 \pm 0,001 |
| KP2 | 0,32 \pm 0,003 |
| KP3 | 0,24 \pm 0,002 |
| KP4 | <LOD |
| Prosječna vrijednost | 0,27 |
| Raspon | 0,24 – 0,32 |

Kao što je vidljivo iz tablice 2, u sva četiri uzorka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca alergeni mlijeka nisu detektirani, odnosno niži su od limita detekcije metode. S druge strane, u uzorcima keksa i čajnih peciva iz pekarnica, u tri od četiri analizirana uzorka, detektirani su alergeni mlijeka. Najniži određeni udio alergena pri tome iznosi $0,24 \text{ mgkg}^{-1}$, a najviši $0,32 \text{ mgkg}^{-1}$. Moguće je da je u pekarnicama, kao manjim proizvodnim pogonima, došlo do unakrsne kontaminacije ili da se rjeđe provode kontrole gotovih proizvoda.

Tablica 3. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca (KT1, KT2, KT3, KT4) i pekarnica (KP1, KP2, KP3, KP4), neposredno vezani uz prisustvo alergena

| Uzorak | Navod vezan uz prisustvo alergena |
|---------------|--|
| KT1 | <i>Može sadržavati mlijeko i orašasto voće u tragovima.</i> |
| KT2 | Bez navoda. |
| KT3 | Bez navoda. |
| KT4 | Može sadržavati tragove orašastog voća i mlijeka. |
| KP1 | Bez navoda. |
| KP2 | Proizvod sadrži gluten i mliječne proizvode. |
| KP3 | Proizvod sadrži gluten i mliječne proizvode. |
| KP4 | Bez navoda. |

Uspoređujući dobivene rezultate sa navodima prisutnim na deklaraciji proizvoda uključenih u istraživanje (tablica 3), vidljive su nesukladnosti u slučaju tri analizirana uzorka, a od kojih su mogući razlozi s jedne strane pretjerana predostrožnost proizvođača, odnosno s druge strane nedovoljna predostrožnost proizvođača vezano uz pružanje informacija o prisutnosti alergena mlijeka. Razlozi nesukladnosti također mogu biti vezani i uz korištenu ELISA metodu, koja usprkos brojnim prednostima te čestoj uporabi u praksi tijekom "*screening*" analiza, ima i određene nedostatke te zahtijeva primjenu potvrđnih metoda. Kod uzoraka keksa i čajnih peciva KT1 i KT4 iz trgovačkih lanaca, tijekom ovog istraživanja nisu detektirani alergeni mlijeka, a vidljivo je da proizvođači iz predostrožnosti korištenjem navoda "može sadržavati" upozoravaju na moguće nenamjerno prisustvo alergena mlijeka u proizvodu. Uzorak KP1 iz pekarnice ne sadrži dodatni upozoravajući navod o prisutnosti alergena mlijeka, međutim tijekom ovog istraživanja ELISA metodom u navedenom uzorku detektirani su alergeni mlijeka u udjelu koji iznosi 0,24 mgkg⁻¹.

Proizvođači su često u nedoumici na koji način postupiti u slučaju pružanja informacija o nenamjernoj prisutnosti alergena. Ukoliko su mogućnosti kontaminacije zanemarive, upozoravajući navodi na deklaracijama iz predostrožnosti nepotrebno ograničavaju potrošača u uporabi takvih proizvoda. Međutim, izostanak navoda o nenamjernoj prisutnosti alergena nepoželjan je u slučaju osjetljivih pojedinaca.

Nekoliko istraživanja upućuje kako se simptomi alergijske reakcije na kravlje mlijeko pojavljuju i kod vrlo malih doza proteina kravljeg mlijeka. Kod dojenčadi simptomi su se pojavili kod konzumacije majčinog mlijeka koje sadrži oko 5 ng mL^{-1} proteina kravljeg mlijeka (od $0,5$ do 50 ng mL^{-1}) (Axelsson i sur., 1986; Machtinger i Moss, 1986; Høst i Samuelsson, 1988; Sorva i sur., 1994). Istraživanje koje je uključivalo odrasle osobe pokazalo je da doze između 50 mg i 250 g uzrokuju pojave simptoma (Nørgaard i Bindslev-Jensen, 1992). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značaj analitičke kontrole prisutnosti alergena mlijeka u hrani te prikladnog informiranja potrošača.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju prikazanih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Imunoenzimskom ELISA metodom detektirani su alergeni mlijeka u tri od osam analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva.
2. Uzorci keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca sa zagrebačkog tržišta nisu sadržavali alergene mlijeka. Usporedbom rezultata imunoenzimskih analiza uzoraka iz trgovačkih lanaca s navodima u okviru informacija o hrani vezanim uz prisutnost alergena mlijeka, uočen je navod "može sadržavati" u slučaju dva uzorka (KT1 i KT4).
3. Udio alergena mlijeka određen u uzorcima keksa i čajnih peciva iz pekarnica sa zagrebačkog područja kretao se u rasponu od $0,24 \text{ mgkg}^{-1}$ do $0,32 \text{ mgkg}^{-1}$, pri čemu jedan od uzoraka u kojem su detektirani alergeni mlijeka (KP1) nije sadržavao navod o prisutnosti alergena mlijeka u okviru informacija o hrani.

6. LITERATURA

Axelsson I., Jakobsson I., Lindberg T., Benediktsson B. (1986) Bovine beta-lactoglobulin in the human milk. A longitudinal study during the whole lactation period. *Acta Paediatrica Scandinavica* **75**: 702 - 707.

Barros A., Cosme F. (2013) Allergenic proteins in foods and beverages. *Food Technology and Biotechnology* **51**: 153-158.

Berni Canani R., Nocerino R., Terrin G., Leone L., Troncone R. (2012) Hospital admissions for food-induced anaphylaxis in Italian children. *Clinical and Experimental Allergy* **42**: 1813 - 1814.

Besler M., Kasel U., Wichmann G. (2002) Determination of hidden allergens in foods by immunoassays. *Internet Symposium on Food Allergens. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **4**: 1 - 18.

Bock S. A., Munoz-Furlong A., Sampson H. A. (2007) Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**: 1016 - 1018.

Butorac A., Marić M., Badanjak Sabolović M., Hruškar M., Rimac Brnčić S., Bačun Družina V. (2013) Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8**: 90 - 101.

Chen Y., Chen Q., He L., Shang B., Zhang L. (2012) Enzyme immunoassay and liquid chromatography-fluorescence detection for amikacin in raw milk. *Food Chemistry* **135**: 380 - 385.

de Luis R., Perez M. D., Sanchez L., Lavilla M., Calvo M. (2007) Development of two immunoassay formats to detect beta-lactoglobulin: influence of heat treatment on beta-lactoglobulin immunoreactivity and assay applicability in processed food. *Journal of Food Protection* **70**: 1691 - 1697.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal* **12**: 72 - 82.

Elizur A., Rajuan N., Goldberg M. R., Leshno M., Cohen A., Katz Y. (2012) Natural Course and Risk Factors for Persistence of IgE-Mediated Cow's Milk Allergy. *The Journal of Pediatrics* **161**: 1 - 7.

HAH (2014) EFSA donijela Znanstveno mišljenje o evaluaciji alergena porijeklom iz hrane, za potrebe označavanja. HAH – Hrvatska agencija za hranu,
< <https://www.hah.hr/efsa-donijela-znanstveno-misljenje-o-evaluaciji-alergena-porijeklom-iz-hrane-za-potrebe-oznacavanja/> > Pristupljeno 4. Srpnja 2018.

Høst A., Samuelsson E. G. (1988) Allergic reactions to raw, pasteurized, and homogenized/pasteurized cow milk: a comparison. A double-blind placebo-controlled study in milk allergic children. *Allergy* **43**: 113 - 118.

Høst A., Halken S. (1990) A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. *Allergy* **45**: 587 - 596.

HZJZ (2018) Alergije – kad preburno reagira imunosti sustav. HZJZ – Hrvatski zavod za javno zdravstvo,
< <https://www.hzjz.hr/sluzba-zdravstvena-ekologija/alergije-kad-preburno-reagira-imunosni-sustav/> > Pristupljeno 29. Lipnja 2018.

Ivančević Ž. (2010) Alergija na hranu. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Placebo d.o.o, Split,
< <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik> > Pristupljeno 4. Srpnja 2018.

Jurčić Z., Oberiter V. (1996) Nepoželjne imunološke (preosjetljivost) i neimunološke (nepodnošljivost) reakcije pri prehrani kravljim mlijekom. *Mljekarstvo* **46**: 41 - 55.

Machtinger S., Moss R. (1986) Cow's milk allergy in breast-fed infants: the role of allergen and maternal secretory IgA antibody. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **77**: 341 - 347.

Maleki S. J., Hurlburt B. K. (2004) Structural and functional alterations in major peanut allergens caused by thermal processing. *Journal of AOAC International* **87**: 1475 - 1479.

Marinculić A., Habrun B., Barbić Lj., Beck R. (2009) Biološke opasnosti u hrani. *HAH-Hrvatska agencija za hranu*. str. 28.

Martelli A., De Chiara A., Corvo M., Restani P., Fiocchi A. (2002) Beef allergy in children with cow's milk allergy; cow's milk allergy in children with beef allergy. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology* **89**: 38 - 43.

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

MBL (2017) The principle and method of ELISA. MBL – Medical & Biological Laboratories Co., LTD.,

< <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html> > Pristupljeno 28. kolovoza 2018.

Monaci L., Tregoeat V., Hengel A., Anklam E. (2006) Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology* **223**: 149 - 179.

Nørgaard A., Bindslev-Jensen C. (1992) Egg and milk allergy in adults. *Allergy* **47**: 503 - 509.

Odedra K. M. (2015) Milk allergy in adults and children. *Nursing standard* **29**: 43 - 48.

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

Pravilnik o informiranju potrošača o nepretpakiranoj hrani (2014) *Narodne novine* **144** (NN 144/2014).

Restani P., Ballabio C., Tripodi S., Fiocchi A. (2009) Meat allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **9**: 265 - 269.

Restani P., Velona T., Plebani A., Ugazio A. G., Poiesi C., Muraro A., Galli C. L. (1995) Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clinical and Experimental Allergy* **25**: 651 - 658.

Ruiter B., Tregoeat V., M'Rabet L., Garssen J., Bruijnzell-Koomen C. A., Knol E. F., Hoffen E. (2006) Characterization of T cell epitopes in alphas1-casein in cow's milk allergic, atopic and non-atopic children. *Clinical and Experimental Allergy* **36**: 303 - 310.

Runje M., Cvrtila Ž. (2006) ELISA u analitici hrane. *Meso* **7**: 92 - 94.

Sharma H.P., Bansil S., Uygungil B. (2015) Signs and Symptoms of Food Allergy and Food-Induced Anaphylaxis. *Pediatric Clinics of North America* **62**: 1 - 16.

Sino Biological Inc (2018) ELISA encyclopedia - ELISA for Food Industry, < <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-applications/food-industry> > Pristupljeno 19. Srpnja 2018.

Sorva R., Makinen-Kiljunen S., Juntunen-Backman K. (1994) Beta-lactoglobulin secretion in human milk varies widely after cow's milk ingestion in mothers of infants with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **93**: 787 - 792.

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

Turkalj M., Mrkić I. (2012) Alergijske reakcije na hranu. *Liječnički vjesnik* **134**: 168 - 173.

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

Vandenplas Y., Brueton M., Dupont C., Hill D., Isolauri E., Koletzko S., Oranje A. P., Staiano A. (2007) Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Archive of Disease in Childhood* **92**: 902 - 908.

Wieslab (2018) Direct ELISA, < <http://www.wieslab.com/diagnostic-services/index.php?headId=74&pageId=104&subId=101> > Pristupljeno 28. kolovoza 2018.

Izjava o izvornosti

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

Matea Horvatić

Matea Horvatić