

Primjena imunoenzimske metode u određivanju alergena kikirikija

Mikulić, Nataša

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:159:169950>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Nataša Mikulić

7079/PT

**PRIMJENA IMUNOENZIMSKE METODE U
ODREĐIVANJU ALERGENA KIKIRIKIJA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitika prehrambenih proizvoda

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Marković

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Primjena imunoenzimske metode u određivanju alergena kikirikija
Nataša Mikulić, 0058206877

Sažetak:

Primjenom imunoenzimske ELISA (eng. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metode analizirano je osam uzoraka žitarica za doručak s čokoladom na prisutnost alergena kikirikija te su dobiveni analitički rezultati uspoređeni s pripadajućim informacijama o hrani analiziranih proizvoda, a vezanim uz prisutnost alergena kikirikija. Analizirani proizvodi uključivali su četiri uzorka iz konvencionalne proizvodnje i četiri uzorka iz organske proizvodnje, a rezultati su pokazali kako je u uzorcima žitarica za doručak iz konvencionalne proizvodnje detektiran viši prosječan udio ($0,54 \text{ mgkg}^{-1}$) alergena kikirikija u odnosu na uzorke žitarica za doručak iz organske proizvodnje ($0,26 \text{ mgkg}^{-1}$). Alergeni kikirikija su u najvišem udjelu ($1,06 \text{ mgkg}^{-1}$) detektirani u jednom od uzoraka (KŽ₂) žitarica za doručak iz konvencionalne proizvodnje. Deklaracije, odnosno informacije o hrani analiziranih proizvoda nisu sadržavale navode o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija.

Ključne riječi: alergija na hranu, ELISA, kikiriki

Rad sadrži: 29 stranica, 7 slika, 5 tablica, 65 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: 9. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Quality Control

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Enzyme immunoassay in determination of peanut allergens
Nataša Mikulić, 0058206877

Abstract:

Using ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) method, eight samples of chocolate breakfast cereals were analyzed for the presence of peanut allergens and the analytical results obtained were compared with the food information on the analyzed products related to the presence of peanut allergens. The analyzed products included four samples from conventional production and four samples from organic production. Results showed that in samples of breakfast cereals from conventional production was a higher average value ($0,54 \text{ mgkg}^{-1}$) of peanut allergens compared to breakfast cereals from organic production ($0,26 \text{ mgkg}^{-1}$). The highest content of peanut allergens ($1,06 \text{ mgkg}^{-1}$) was detected in one of the samples (KŽ₂) of conventional breakfast cereals. Declaration of the analyzed products did not contain any indication of the presence of peanut allergens.

Keywords: ELISA, food allergy, peanut

Thesis contains: 29 pages, 7 figures, 5 tables, 65 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: 9th July 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ALERGIJE NA HRANU	2
2.1.1. Nutritivni alergeni	2
2.1.2. Učestalost alergija na hranu	3
2.1.3. Alergija na kikiriki	4
2.1.4. Prevencija alergija na hranu	5
2.2. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA	6
2.2.1. ELISA metoda	7
2.2.2. ELISA metoda u određivanju alergena kikirikija	9
2.3. OZNAČAVANJE ALERGENA U HRANI	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Uzorci	12
3.1.2. Reagensi	12
3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor	13
3.2. METODE RADA	15
3.2.1. Priprema uzoraka	15
3.2.2. Priprema reakcijskih otopina	15
3.2.3. ELISA test	16
3.2.3.1. Princip ELISA testa	16
3.2.3.2. Postupak	16
3.2.4. Obrada podataka	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
5. ZAKLJUČAK	21
6. LITERATURA	22

1. UVOD

Alergije na hranu su iz godine u godinu u porastu, a alergija na kikiriki je jedna od alergija čiji su simptomi alergijske reakcije izuzetno ozbiljni. Čak i male količine kikirikija kod osjetljivih osoba mogu izazvati po život opasan anafilaktički šok. Izbjegavanje hrane koja sadrži kikiriki zasad je najučinkovitija metoda za prevenciju alergijske reakcije te je zbog toga značajno pravilno označiti proizvode. Kako bi se potrošači zaštitili od slučajne konzumacije alergena te pravilno informirali, odgovornost proizvođača očituje se i u pristupu problematici nenamjerne prisutnosti alergena u hrani. Jednu od najčešće korištenih metoda za detekciju alergena u hrani predstavlja imunoenzimska ELISA (eng. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) metoda koja se bazira na specifičnom vezanju antitijela i antigena.

Cilj ovog rada stoga je bio, primjenom imunoenzimske ELISA metode, odrediti udio alergena kikirikija u četiri uzorka žitarica za doručak s čokoladom iz konvencionalne proizvodnje te četiri uzorka žitarica za doručak s čokoladom iz organske proizvodnje, kao i usporediti dobivene rezultate s navodima o prisutnosti alergena kikirikija u okviru deklaracija, odnosno informacija o hrani analiziranih proizvoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALERGIJE NA HRANU

Alergija na hranu je klinička reakcija izazvana imunološkim odgovorom na neki od sastojaka hrane, a najčešće protein (Katalenić, 2007). Za razliku od nutritivnih alergija, intolerancija na hranu nije posredovana imunološkim sustavom. To su individualne neželjene reakcije na određenu hranu koje ponekad imaju slične simptome kao alergije na hranu te ih je važno radi toga razlikovati (Koppelman i Hefle, 2006). Primjer intolerancije na hranu je intolerancija na laktozu kojoj je uzrok nedostatak enzima koji razgrađuje laktozu. Nerazgrađena laktoza koristi se kao supstrat za bakterijsku fermentaciju u crijevima i izaziva nastanak nadutosti, plinova i drugih probavnih tegoba (Szilagy i Ishayek, 2018). Neželjene simptome intolerancije na hranu je moguće kontrolirati izbjegavanjem tih namirnica, a nekad i samo smanjenjem količine koju se konzumira. Kod alergija na hranu je važno izbjegavati svu hranu s određenim alergenom te je potrebno obratiti pozornost i na tragove alergena u proizvodima (Koppelman i Hefle, 2006). Alergije na hranu najčešće uključuju one posredovane imunoglobulinom E (Ig-E ovisne), a mogu biti posredovane i ostalim mehanizmima imunološkog sustava (Ig-E neovisne) (Sicherer i Sampson, 2006). Ig-E neovisne alergije na hranu su najčešće odgođene reakcije koje se javljaju 6-24 sata nakon konzumacije hrane s određenim alergenom, a mogu trajati do nekoliko dana. Ig-E posredovane reakcije su reakcije kod kojih se simptomi javljaju ubrzo nakon konzumacije hrane s prisutnim alergenom (nekoliko minuta do 1 sat). Kod Ig-E ovisnih alergija na hranu stvaraju se specifična antitijela kao odgovor imunološkog sustava na prvi doticaj s alergenom iz hrane. Ta antitijela se vežu na mastocite u tkivima ili bazofile u krvi. Prvi doticaj s alergenom ne izaziva nastanak simptoma alergijske reakcije ali svaki sljedeći put razviti će se alergijska reakcija. Primjeri Ig-E ovisne reakcije su alergija na kikiriki, mlijeko i jaja (Koppelman i Hefle, 2006).

2.1.1. Nutritivni alergeni

Iako je prehrana ljudi diljem svijeta raznolika, postoji nekoliko alergena koji su u cijeloj populaciji izraženi. Najčešći izvori alergena su kravlje mlijeko, jaja, kikiriki, orašasto voće, riba i školjke (Sampson, 2004). Kod djece se najčešće javljaju alergije na mlijeko, jaja, kikiriki, soju, pšenicu i ribu, a kod odraslih na kikiriki, lješnjake, ribu i voće (HAH, 2009).

Tablica 1. Prevalencija alergija na najčešće alergene u djece i odraslih (Sampson, 2004)

Hrana	Djeca	Odrasli
Mlijeko	2,5 %	0,3 %
Jaja	1,3 %	0,2 %
Kikiriki	0,8 %	0,6 %
Orašasto voće	0,2 %	0,5 %
Riba	0,1 %	0,4 %
Školjke	0,1 %	2,0 %
Ostalo	6 %	3,7 %

Najčešći alergeni diljem svijeta razlikuju se ovisno o kulturi, pa se tako u Turskoj najčešćim alergenima smatraju govedina, kravlje mlijeko, kakao, jaja i kivi (Orhan, 2009). U Kuwaitu su to jaja, riba, školjke, kikiriki i orašasto voće (Ziyab, 2019). U porastu je broj slučajeva alergija na meso peradi i crveno meso, rižu, povrće, voće te kakao i kavu (HAH, 2009).

2.1.2. Učestalost alergija na hranu

Prevalencija alergija na hranu u Americi je 5 % među odraslim osobama i 4-8 % među djecom, a slično je i u Europi (Umetsu i sur., 2015; Prescott i sur., 2013). Australija ima najveću prevalenciju alergija na hranu, čak 10 % djece ima neku od alergija na hranu s time da 8,9 % djece ima alergiju na jaja te 3 % na kikiriki (Osborne i sur., 2011). U nekim djelovima svijeta učestalost alergija na hranu je znatno niža, pretpostavlja se zbog genetske predispozicije, načina prehrane te načina prerade hrane (Mikita i Padlan, 2012). Primijećeno je da je u razvijenijim državama učestalost alergija na hranu viša što se pripisuje načinu života (Prescott i sur., 2013).

2.1.3. Alergija na kikiriki

Alergija na kikiriki je najčešće doživotna i ranije se smatralo da je se ne može prerasti kao alergiju na kravlje mlijeko ili jaja. Međutim, primijećeno je da se kod 20 % djece razvije tolerancija na kikiriki tijekom odrastanja. Djeca koja postanu tolerantna na kikiriki, najčešće nemaju prisutnih drugih alergija na hranu, a ona koja nakon 5. godine života i dalje imaju alergiju na kikiriki najvjerojatnije je neće prerasti (Hourihane i sur., 1998).

Kikiriki je plod koji se ubraja u porodicu mahunarki. Bogat je proteinima, vlaknima i mastima. Sadrži oko 26 % proteina. Proteini kikirikija obično se dijele na globuline i albumine. Globulini čine 87 % ukupnih proteina, a najzastupljeniji su Arahin i Konarhin (Arya i sur., 2016). Klasificirano je 17 alergena kikirikija od Ara h1 do Ara h17 (WHO/IUIS, 2019). Najznačajniji alergeni kikirikija u Americi su Ara h1, Ara h2, Ara h3. U Švedskoj najviše ljudi posjeduje antitijela za Ara h8, a u Španjolskoj za Ara h9, dok je najčešći alergen kikirikija u Europi Ara h2 koji ujedno izaziva i najozbiljnije alergijske reakcije (Palladino i Breiteneder, 2018). Ara h12 i Ara h13 su reaktivni s antitijelima ljudi sa jako izraženom alergijom na kikiriki (Petersen, 2015).

Način prerade kikirikija je važan čimbenik njegove sposobnosti da djeluje kao alergen. Ovisno o postupku prerade epitopi prisutni u hrani mogu biti uništeni ili pak novi epitopi, koji se nazivaju neoalergeni, mogu biti formirani (Vanga i sur., 2017). To se događa radi promjene strukture proteina i promjenama u Ig-E vezanju (Mills i sur., 2009; Schmitt i sur., 2010). Iako se u Kini i Americi kikiriki podjednako konzumira, u Kini manji broj ljudi pati od alergije na kikiriki. U Kini se kikiriki najčešće konzumira kuhan ili pržen, a u Americi najčešće suho prženi (Mikita i Padlan, 2012). Primijećeno je da se intenzitet Ig-E vezanja s Ara h1, Ara h2 i Ara h3 smanjuje nakon prženja i kuhanja (Beyer i sur., 2001). Prženjem se mijenja struktura epitopa Ara h2 i tako smanjuje alergenost kikirikija (Zhang i sur., 2016). Iako se alergenost kikirikija značajno smanjuje tijekom procesa kuhanja (Blanc i sur., 2011), tako procesiran kikiriki ne može se klasificirati kao hipoalergen (Comstock i sur., 2016). Maleki i sur. (2000) dokazali su kako se suho prženjem kikirikija povećava njegova alergenost jer dolazi do reakcije između slobodne amino grupe alergena i reducirajućih šećera, Maillardove reakcije. Kao posljedica Maillardove reakcije Ara h1 i Ara h2 postaju stabilniji (veći kapacitet Ig-E vezanja) i otporniji na toplinu i probavu. Maillardove reakcije češće su u hrani koja je obrađena suhim toplinskim procesima kao što su pečenje, prženje i pečenje na žaru (Gupta i sur., 2018).

Simptomi alergijske reakcije na kikiriki se javljaju najčešće nakon nekoliko minuta nakon konzumacije proizvoda koji sadrži kikiriki. Nisu svi pojedinci jednako osjetljivi na alergen pa i intenzitet simptoma varira od osobe do osobe. Najčešći simptomi su osip, crvenilo, otok kože,

suzenje nosa, otežano disanje te probavne smetnje, a moguća je i životno opasna anafilaksija. Simptomi anafilaksije su stezanje u prsima i oko grkljana, otežano gutanje, a mogući je i gubitak svijesti radi zatvaranja gornjih dišnih puteva (HAH, 2009).

2.1.4. Prevencija alergija na hranu

Nakon što je dijagnosticirana alergija na hranu, preporučuje se kompletna eliminacija hrane koja sadrži taj alergen (Ball i sur., 2011). Svaka eliminacija veće skupine namirnica trebala bi se odvijati pod nadzorom nutricionista kako bi se osiguralo da su nutrijenti koje sadrže namirnice koje su izbačene iz prehrane adekvatno nadomješteni (Heine, 2015).

Za neke se alergije tolerancija postiže vremenom, pa se preporučuje da se svake 1-2 godine ponovi test na alergije na hranu kako se ne bi nepotrebno izbjegavala određena hrana. Osim adekvatne prehrane, neki bolesnici koriste i lijekove (Turkalj i Mrkić, 2012).

Prethodno se smatralo kako se eliminacijom alergena iz prehrane trudnica i dojilja kao i odgođenim uvođenjem hrane koja je potencijalni alergen prevenira nastanak alergija na hranu (Martinis, 2004; Sampson, 2002). Kasnije je dokazano kako takav pristup ne prevenira nastanak alergije na hranu (Kolaček, 2011), a nekim istraživanjima je dokazano i suprotno. Primijećeno je kako je kod osoba iz Izraela koje žive u Ujedinjenom Kraljevstvu prevalencija alergija na kikiriki 10 puta veća nego kod onih koje žive u Izraelu. U Izraelu djeca konzumiraju veće količine kikirikija u 1. godini života, a u Ujedinjenom Kraljevstvu je on izbjegavan sukladno tadašnjim smjernicama (Toit i sur., 2008).

2015. godine u "New England Journal of Medicine" objavljeni su rezultati LEAP (eng. *Learning Early About Peanut Allergy*) istraživanja koji ukazuju na prednosti uvođenja kikirikija u ranoj dobi. 640 djece u dobi od 4 do 11 mjeseci koja su bila alergična na jaja i imala ekcem podijeljeno je u dvije skupine - prvu koja nije konzumirala kikiriki do 5. godine života i drugu koja je konzumirala kikiriki do 5. godine života. Nakon tog razdoblja djeca su opet testirana na alergiju na kikiriki. Od 530 djece koja prethodno nisu imala mjerljiv rezultat na kožnom testu na kikiriki 13,7 % djece iz 1. skupine i 1,9 % djece iz 2. skupine sada je imalo pozitivan rezultat. Među djecom koja su na početku istraživanja imala mjerljiv rezultat na kožnom testu na kikiriki 35,3 % iz 1. skupine i 10,6 % iz 2. skupine je dijagnosticirana alergija na kikiriki (Toit i sur., 2015).

Nove smjernice SAD iz 2017. godine preporučuju uvođenje kikirikija od 4 do 6 mjeseci života u cilju prevencije alergije (NIH-NIAD, 2017). Postoje još mnogo istraživanja kojima je cilj pronaći nove načine prevencije i terapije kako bi se poboljšala kvaliteta života osoba s nutritivnim alergijama (Umetsu i sur., 2015; Tang i sur., 2015).

2.2. METODE ODREĐIVANJA ALERGENA

Najčešće korištene metode za određivanje alergena su imunokemijske: RAST (eng. *Radioallergosorbent test*), EAST (eng. *Enzyme Allergosorbent test*), dot-immunoblotting metoda, ELISA metoda (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), RIE (eng. *Rocket Immuno-electrophoresis*) i molekularno-genetska metoda - PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) (Koppelman i Hefle, 2006). Izbor metode ovisi o hrani koja se analizira, njenom načinu prerade i proizvodnje, alergenu i željenom limitu detekcije ili kvantifikacije (Poms sur., 2004).

Pomoću RIE metode je prvi put imunološki dokazana prisutnost proteina kikirikija (Koppelman i Hefle, 2006). Prvotno je RIE metodom postignut limit detekcije od 2,5 mgkg⁻¹ bez prisutnosti križnih reakcija tijekom analiza alergena kikirikija u uzorcima čokolada, *mueslija* i sladoleda. Osim kikirikija, metoda je korištena i za određivanje alergena jaja, lješnjaka, mlijeka (Besler i sur., 2002).

RAST metoda za određivanje tragova kikirikija korištena je prvi puta tijekom analize osam uzoraka suncokretovog maslaca u kojima su u većini detektirani tragovi maslaca od kikirikija radi korištenja zajedničke opreme tijekom postupka proizvodnje. Metoda se bazira na određivanju razine specifičnih IgE antitijela (Yunginger i sur., 1983). Jedan od većih nedostataka RAST metode je to što koristi humana IgE antitijela, obzirom da je njihova količina limitirana, a osim toga variraju i po osjetljivosti i specifičnosti (Besler i sur., 2002).

IgE immunoblotting kao i RAST metoda koristi humana IgE antitijela. Obje metode mogu biti korisne u raznim istraživanjima, dok im je praktična primjena ograničena. Schappi i sur. (2011) su koristili Ig-E immunoblotting kako bi detektirali alergene kikirikija (Ara h1, Ara h2, Ara h3 i Ara h4) u žitaricama i kukuruznim krekerima. Limit detekcije je iznosio 50 mgkg⁻¹.

Molekularno-genetske metode omogućuju određivanje alergena pomoću detekcije određenog dijela DNA sekvence. Za analizu DNA koristi se lančana reakcija polimeraze (PCR - *polimerase chain reaction*). To je brza, jednostavna i specifična metoda koja se često koristi kao potvrdna metoda nakon ELISA testa (Butorac i sur., 2013). García i sur. (2017), koristeći PCR, detektirali su alergene kikirikija u različitim uzorcima hrane uz limit detekcije od 0,1 mgkg⁻¹.

Lateral flow - imunokromatografska metoda i imunokromatografske trakice su jednostavne za korištenje, pristupačne i brze vrste ELISA testova koje služe za detekciju alergena ali ne i za njihovu kvantifikaciju. Dostupne su za badem, lješnjak, gluten, kikiriki, mlijeko i jaja s limitom detekcije od 1 do 25 mgkg⁻¹. Osim toga, za detekciju alergena koriste se i biosenzori koji u kratkom vremenu daju rezultate, a njihova najveća prednost je što se izvode bez prethodne

pripreme uzorka. Oni se baziraju na aptamerima. Aptameri su jednolančani DNA i RNA oligonukleoidi koji mogu vezati specifičnu ciljanu molekulu. Koriste se kao zamjena za antitijela u detekciji alergena (Prado i sur., 2016). Tran i sur. (2013) integrirali su aptamere u biosenzore za detekciju Ara h1 proteina u kikirikiju.

Sve se više istražuju tehnike koje se baziraju na masenoj spektrometriji. Masena spektrometrija kombinirana s tekućinskom kromatografijom pokazala se kao metoda s visokom selektivnosti i osjetljivošću. MRM (eng. *Multiple Reaction Monitoring*) je kvantitativna metoda koja je bazirana na masenoj spektrometriji i može se koristiti za analizu alergena. Glavna prednost joj je što omogućuje određivanje više proteina istovremeno (Prado i sur., 2016). Koristeći MRM baziranu na analizi peptida postignut je limit kvantifikacije od 1 mgkg^{-1} za alergene kikirikija (Careri i sur., 2007). Razvijena je i metoda koja se bazira na kombinaciji tekućinske kromatografije i masene spektrometrije koja može istovremeno analizirati 7 alergena (mlijeko, jaja, soju, lješnjak, kikiriki, orah i badem) (Heick i sur., 2011).

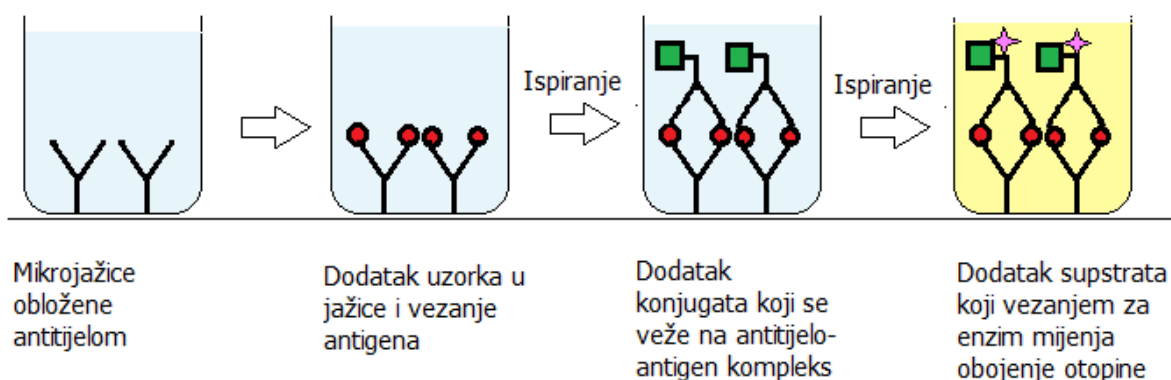
2.2.1. ELISA metoda

ELISA metoda je imunoenzimska metoda koja se temelji na specifičnom vezanju antitijela i antigena. Metoda je kvalitativna i kvantitativna (Butorac i sur., 2013). Odlikuje se visokom osjetljivošću pa je pogodna za određivanje niskih koncentracija tvari u uzorcima. U prehrambenoj industriji se najčešće koristi za određivanje tragova pesticida, antibiotika, mikotoksina i alergena u hrani (Koppelman i Helfle, 2006).

Postoje više tipova ELISA testa: indirektna ELISA, "sendvič" ELISA, konkurentna ELISA i nova višestruka prijenosna metoda pomoću mikrotitarskih ploča od kojih se za određivanje alergena najviše koriste "sendvič" i konkurentna ELISA (Butorac i sur., 2013).

1) "Sendvič" ELISA

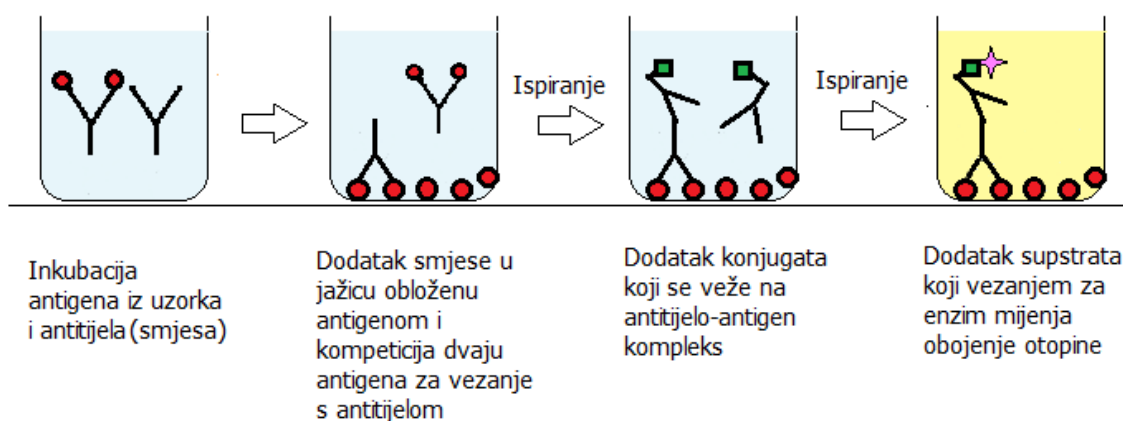
Mikrojažice su kod "sendvič" ELISA testa najčešće obložene specifičnim antitijelima za koje se veže antigen iz uzorka. Nakon ispiranja dodaje se konjugat, antitijelo vezano s enzimom, koje se veže na antigen. Dodatkom supstrata za enzim pojavljuje se obojenje koje je proporcionalno količini prisutnog antigena u uzorku. STOP otopina mijenja obojenje iz plavog u žuto i potom slijedi spektrofotometrijsko mjerenje pomoću mikročitača. Antigen koji se određuje mora posjedovati dva vezna mjesta za vezanje antitijela kako bi mogao vezati oba antitijela, ono imobilizirano u mikrojažicama i ono vezano s enzimom (Koppelman i Hefle, 2006) (Slika 1).



Slika 1. Prikaz "sendvič" ELISA metode (Anonymous, 2015)

2) Konkurentna ELISA

Konkurentna ELISA metoda najčešće uključuje mikrojažice obložene specifičnim antigenom. U mikrojažice se dodaje smjesa primarnog antitijela i antigena iz uzorka čime dolazi do kompeticije vezanja između antigena iz uzorka i imobiliziranog antigena za stvaranje kompleksa s antitijelom. Prednost za stvaranje kompleksa antitijelo-antigen ima antigen iz uzorka, obzirom da prvi stupa u kontakt s antitijelom. Antitijela koja se nisu vezala za antigen iz uzorka, vežu se za imobilizirani antigen. Zatim se u jažice dodaje konjugat koji se veže za kompleks antitijelo-antigen i koji dodatkom supstrata uzrokuje obojenje koje se potom mjeri spektrofotometrijski. Kod ovog tipa ELISA testa, intenzitet obojenja otopine je obrnuto proporcionalan koncentraciji antigena u analiziranom uzorku (Besler i sur., 2002) (Slika 2).



Slika 2. Prikaz konkurentne ELISA metode (Anonymous, 2015)

Neke od prednosti ELISA metode su njena jednostavnost i brzina te mogućnost automatizacije. Potrebno je oko 30 minuta do 4 sata za izvođenje "sendvič" ELISA testa i 4 do 8 sati za konkurentni ELISA test. Testovi najčešće koriste standardiziran format od 96 jažica. Metoda je osjetljiva i selektivna, a reagensi koji se koriste su lako dostupni. Iako je brza, metoda ima duže razvojno vrijeme. Moguće su križne reakcije sa spojevima slične strukture kao i lažno pozitivni rezultati, te je zbog toga potrebna i potvrдна metoda. Ne postoji mogućnost analize više različitih alergena istovremeno te je izražen učinak matriksa (Koppelman i Hefle, 2006).

2.2.2. ELISA metoda u određivanju alergena kikirikija

ELISA metoda je jedna od najčešće korištenih metoda za detekciju i kvantifikaciju alergena u hrani. U literaturi je opisana kvantifikacija različitih alergena ovom metodom, uključujući kravljje mlijeko, lješnjake, kikiriki, soju, glutena, uz limit detekcije od 0,1 do 20 mgkg⁻¹ (Prado i sur., 2016).

Prvu su ELISA metodu za detekciju tragova kikirikija opisali Hefle i sur. (1994) sa limitom detekcije ispod 40 mgkg⁻¹. Nakon toga istraživanja su bila usmjerena na postizanje što nižeg limita detekcije. Konkurentnom ELISA metodom koju su opisali Yeung i Collins (1996) postignut je limit detekcije od 0,4 mgkg⁻¹ bez križnih reakcija s ostalim sastojcima analizirane hrane, kao što su čokolada, keksi i razni konditorski proizvodi.

Često se koriste komercijalni ELISA test setovi za detekciju i kvantifikaciju alergena kikirikija, a sve više i setovi bazirani na PCR metodi. ELISA setovi su osim za kikiriki razvijeni i za badem, rakove, jaja, lješnjak, mlijeko, sezam i soju. Limit detekcije i limit kvantifikacije razlikuju se ovisno o alergenu koji se analizira kao i proizvođaču određenog seta za analizu (Koppelman i Hefle, 2006).

2.3. OZNAČAVANJE ALERGENA U HRANI

Slučajna konzumacija kikirikija za osobe s nutritivnom alergijom može prouzročiti neugodne simptome ali i izazvati po život opasnu anafilaksiju (Keck-Gassenmeier i sur., 1999). Označavanje hrane se pokazalo kao najučinkovitija metoda zaštite potrošača s nutritivnim alergijama od slučajne konzumacije proizvoda sa prisutnim alergenima (Uredba EU, 2011). Potrošači se zato oslanjaju na proizvođače hrane od kojih očekuju da im osiguraju pouzdane informacije o mogućim alergenima u okviru informacija o hrani (Van Hengel, 2007).

Uredba o informiranju potrošača o hrani (Uredba EU 1169/2011) u Europskoj Uniji je na snazi od 25. listopada 2011. godine, a u Hrvatskoj je u primjeni od 13. prosinca 2014. godine. Njome

su definirani propisi koji potrošačima pružaju potrebne informacije o prehrambenim proizvodima. Prema Uredbi EU (2011) deklaracija zapakirane hrane treba sadržavati: a) naziv hrane; b) popis sastojaka; c) popis svih sastojaka ili pomoćnih tvari u postupku proizvodnje koji su navedeni u Prilogu II. ili dobiveni od tvari ili proizvoda iz Priloga II. koji uzrokuju alergije ili intolerancije, a koji su upotrijebljeni u postupku proizvodnje ili pripreme hrane i koji su prisutni u gotovom proizvodu, čak i u izmijenjenom obliku; d) količinu određenih sastojaka ili kategorija sastojaka; e) neto količinu hrane; f) datum minimalne trajnosti ili „upotrijebiti do” datum; g) uvjete skladištenja i/ili upotrebe; h) naziv i adresu subjekta u poslovanju hranom; i) zemlju ili mjesto podrijetla; j) upute za upotrebu ako pravilna upotreba hrane nije moguća bez uputa; k) stvarnu alkoholnu jakost po volumenu, za pića koja sadrže više od 1,2 % vol. alkohola; l) nutritivnu deklaraciju. Sastojke koji uzrokuju alergije ili intolerancije na hranu obavezno je u popisu sastojaka dodatno naglasiti, na primjer podebljanim slovima.

Alergeni koje je potrebno obavezno naznačiti jesu: 1. žitarice koje sadrže gluten i proizvodi tih žitarica; 2. rakovi i proizvodi od rakova; 3. jaja i proizvodi od jaja; 4. riba i riblji proizvodi 5. mekušci te proizvodi od njih; 6. kikiriki i proizvodi od kikirikija; 7. soja i proizvodi od soje; 8. lupina i proizvodi od lupine; 9. mlijeko i mliječni proizvodi (uključujući laktozu); 10. orašasti plodovi (badem, lješnjak, orah, indijski oraščić, pekan oraščić, brazilski oraščić, pistacija i makadamija oraščić) i njihovi proizvodi; 11. celer i proizvodi od celera; 12. gorušica i proizvodi od gorušice 13. sezam i proizvodi od sezama 14. sumporov dioksid i sulfiti u koncentraciji većoj od 10mgkg^{-1} ili 10mgL^{-1} izraženi kao SO_2 (Uredba EU, 2011).

Alergeni čije je naznačavanje obavezno razlikuju se diljem svijeta. Oni koje je gotovo svugdje obavezno navoditi su mlijeko, jaja, žitarice koje sadrže gluten, rakovi, kikiriki. Navođenje ostalih alergena ovisi o načinu prehrane u određenom geografskom području (Bucchini i sur., 2016). U Sjedinjenim Američkim Državama, FDA (eng. *Food and Drug Administration*) navodi osam izvora alergena (mlijeko, jaja, pšenica, soja, kikiriki, orašasto voće, riba i rakovi) (FDA, 2004). U Australiji se uz tih osam izvora alergena navodi sezam (Zurzolo i sur., 2013), dok je u Japanu obavezno označavanje pšenice, heljde, jaja, mlijeka, kikirikija i rakova (Akiyama i sur., 2011).

Označavanje mogućih i nenamjerno prisutnih tvari u hrani koje izazivaju alergije i intolerancije je dobrovoljno (Uredba EU, 2011). Alergeni se mogu naći u hrani u kojoj nisu navedeni kao sastojci uslijed križne kontaminacije radi proizvodnje proizvoda koji sadrže određene alergene u istoj tvornici, koristeći zajedničku opremu. Najčešći navodi na deklaracijama koji upućuju na moguću prisutnost nekih alergena su „Može sadržavati [alergen]” „Može sadržavati tragove [alergen]” „Proizvedeno u tvornici u kojoj se koristi [alergen]” . Potrošačima su takvi navodi često zbunjujući i neke od njih povezuju s većim rizikom kontaminacije s određenim alergenom

iako se u tom pogledu ne razlikuju (Zurzolo i sur., 2013). Neki potrošači, uslijed povećanja učestalosti tih navoda, iste ignoriraju misleći da se tvrtke žele time samo pravno ograditi (Hefle i sur., 2007). Najprihvatljivijim navodima za potrošače smatrali su se „Nije prikladno za alergične osobe“ ili „Proizvod je bez [alergen]“ (Van Hengel, 2007).

Sve češći navodi o mogućoj prisutnosti alergena doveli su i do nepotrebnog navođenja alergena kod proizvoda u kojima nisu prisutni (Mills i sur., 2004). Istraživanje 509 proizvoda sa i bez navoda (254 od svake kategorije) u Ujedinjenom Kraljevstvu pokazalo je kako u proizvodima s navodima o mogućoj prisutnosti glutena, mlijeka, lješnjaka i kikirikija oni nisu bili detektirani u 19 %, 18 %, 44 %, odnosno 45 % proizvoda (Hirst, 2014). U istraživanju u Irskoj od 38 proizvoda sa navodima o mogućoj prisutnosti kikirikija, u samo dva proizvoda detektirane su mjerljive količine kikirikija (Robertson i sur., 2013). Nepotrebno označavanje u slučaju kada alergeni nisu prisutni, potrošačima sužava izbor proizvoda. S druge strane, zabilježeni su slučajevi gdje mogućnost prisutnih alergena nije naznačena, a u proizvodu su prisutni alergeni u koncentracijama koje bi izazvale alergijsku reakciju kod osjetljivih osoba (Bucchini i sur., 2016). RASFF (eng. *Rapid Alert System for Food and Feed*) je 2017. godine objavila godišnje izvješće u kojem su prikazani slučajevi nedeklariranih alergena u prehrambenim proizvodima gdje se kikiriki našao na vrhu popisa uz mlijeko, jaja, soju, gluten, senf i orašasto voće. Grupa proizvoda u kojima su najčešće bili nedeklarirani alergeni su „Žitarice i pekarski proizvodi“ u koje se ubrajaju žitarice za doručak, keksi, kruh, kolači i slastice (RASFF, 2018).

U Australiji je razvijen alat za procjenu rizika križne kontaminacije i njene količine te njihovo pravilno deklariranje, VITAL (eng. *Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling*). VITAL se brine da proizvođači prehrambenih proizvoda posvete više pažnje otkrivanju mogućih uzroka križne kontaminacije i detekciji prisutnih alergena. VITAL-om se pokušava postići standardizacija metoda detekcije alergena i njihovog deklariranja. Uključuje i uvođenje novog navoda „Može sadržavati [alergen]“ koji se pokazao dobro prihvaćen od strane potrošača i koji se razmatra kao zamjena za sve ostale navode (Taylor i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Tijekom ovog istraživanja analizirano je osam uzoraka žitarica za doručak s čokoladom, različitih proizvođača, a prikupljenih na zagrebačkom tržištu. Pri tome je četiri od osam proizvoda iz konvencionalne proizvodnje, a ostala četiri su iz organske proizvodnje. Uzorci su homogenizirani i označeni kodovima te ekstrahirani.

3.1.2. Reagensi

Korišteni su sljedeći reagensi (Slika 3):

- ❖ AgraQuant- Peanut Enzyme, Romer Labs, Austrija (otopina konjugata)
- ❖ AgraQuant- Substrate, Romer Labs, Austrija (otopina supstrata)
- ❖ AgraQuant- Stop Solution, Romer Labs, Austrija (stop otopina)
- ❖ AgraQuant, Peanut, Extraction & Sample Dilution Buffer, Romer Labs, Austrija (ekstrakcijski pufer)
- ❖ AgraQuant, Peanut, Wash Buffer, Romer Labs, Austrija (pufer za ispiranje) .



Slika 3. Reagensi iz seta za ELISA test

3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor

Korišteni su sljedeći laboratorijski uređaj:

- ❖ analitička vaga (YMC Cho, tip JK-180 Mikrotehna Zagreb)
- ❖ vorteks (VWR, tip VV3)
- ❖ vodena kupelj (INKO, Zagreb)
- ❖ centrifuga (Rotofix 32A, Hettich, Njemačka) (Slika 4)
- ❖ sjeckalica za hranu
- ❖ ELISA čitač uz filter od 450 nm i računalni program Gen 5 (Bio Tek Instruments) (Slika 5).



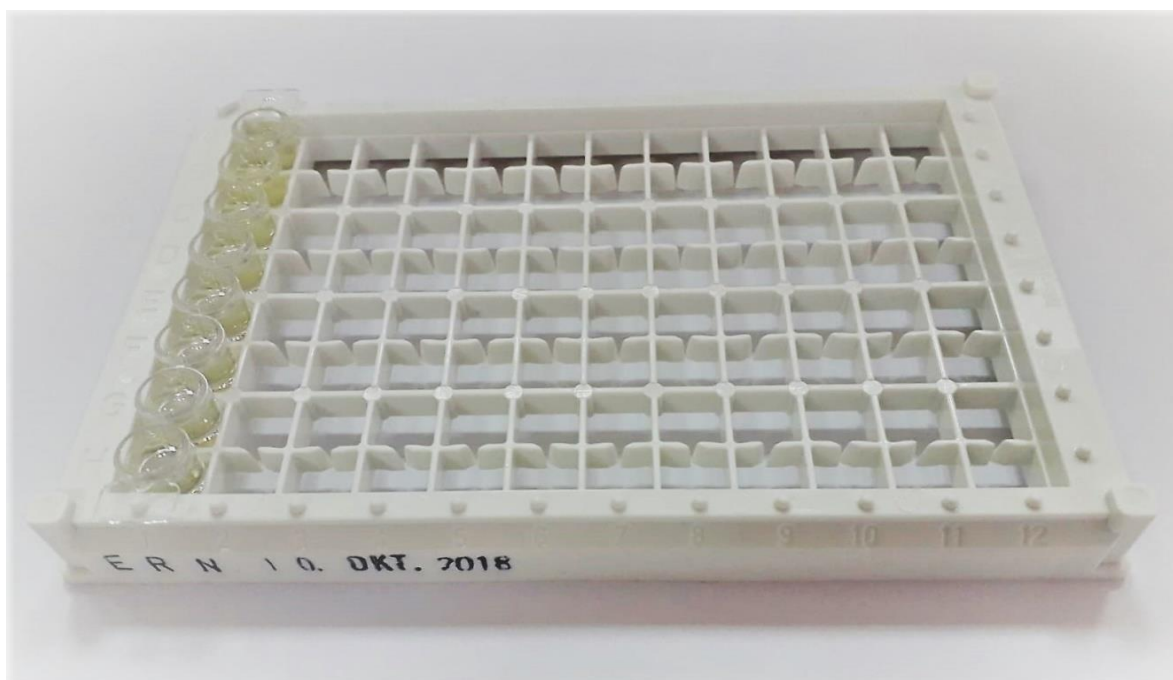
Slika 4. Centrifuga



Slika 5. ELISA čitač

Korišteno je sljedeće laboratorijsko posuđe i pribora:

- ❖ automatska pipeta
- ❖ trbušasta pipeta (5, 10, 25 i 50mL)
- ❖ nastavak za pipetu
- ❖ propipeta
- ❖ staklena čaša od 100mL
- ❖ odmjerna tikvica od 25 mL
- ❖ plastična žličica
- ❖ staničevina
- ❖ stakleni lijevak
- ❖ filter papir
- ❖ Erlenmayerova tikvica
- ❖ nosač za mikrojažice (Slika 6)
- ❖ plastične epruvete za centrifugiranje s navojnim čepom
- ❖ plastične posudice s navojnim čepom.



Slika 6. Nosač za mikrojažice

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema uzoraka

Uzorci su prvo homogenizirani pomoću sjeckalice za hranu te stavljeni u plastične posudice s navojnim čepom te označeni kodovima. Izvagan je 1g homogeniziranog uzorka na analitičkoj vazi, a zatim je u plastičnu epruvetu sa izvaganim homogeniziranim uzorkom dodano 20 mL razrijeđenog pufera za ekstrakciju. Nakon toga je sadržaj epruvete vorteksiran. Otopina ekstrakcijskog pufera i uzorka inkubirana je pri 60 °C u prethodno zagrijanoj vodenoj kupelji u trajanju od 15 minuta. Zatim je centrifugirana 10 minuta pri 2000 okretaja/min kako bi se dobio bistri supernatant koji je na kraju profiltriran pomoću staklenog lijevka i filter papira u Erlenmeyerovu tikvicu. Dobiven filtrat je korišten za izvođenje ELISA testa.

3.2.2. Priprema reakcijskih otopina

Ekstrakcijski pufer je pripremljen na način da je razrijeđen u omjeru 1:10 destiliranom vodom. Koncentrat pufera za ispiranje je također razrijeđen u omjeru 1:10 i prije korištenja čuvan pri 4 °C.

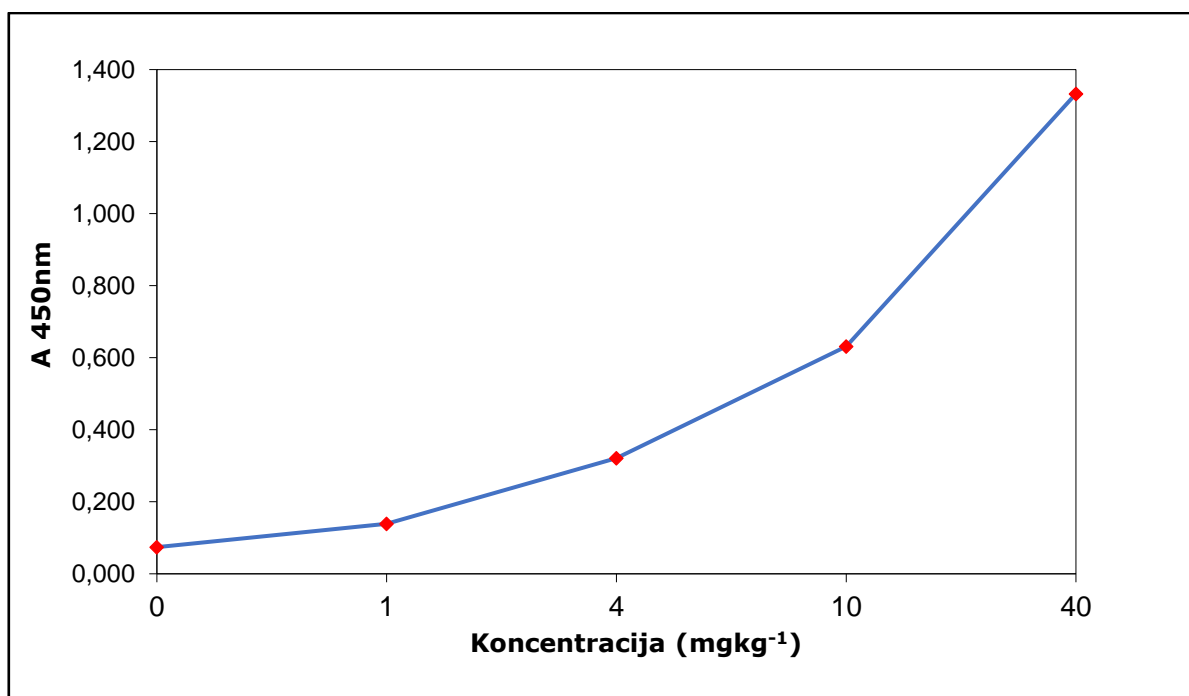
3.2.3. ELISA test

3.2.3.1. Princip ELISA testa

Korišteni ELISA test predstavlja imunoenzimski test „sendvič“ tipa. Proteini kikirikija ekstrahiraju se iz uzorka razrijeđenim puferom za ekstrakciju. Na cijeloj površini mikrojažica nanosena su antitijela u tankom sloju. Ekstrahirani uzorak ili standard se nanose u mikrojažice. Proteini kikirikija se vežu za antitijela u jažicama. Nakon ispiranja, dodaje se konjugat (antitijela vezana sa enzimom) i nosač sa mikrojažicama se inkubira. Nakon drugog ispiranja dodaje se supstrat za enzim i razvija se plavo obojenje. Nakon inkubacije, STOP otopina mijenja boju iz plave u žutu. Intenzitet obojenja je direktno proporcionalan koncentraciji kikirikija u uzorku. Obojenje se mjeri spektrofotometrijski pri 450 nm, a uz pomoć baždarnog dijagrama standarda kikirikija, određuje se koncentracija kikirikija u uzorku.

3.2.3.2. Postupak

Na nosač mikrojažica postavljene su mikrojažice obložene tankim slojem antitijela. Automatskom pipetom dodano je 100 μ L dobivenog filtrata u mikrojažice. Nosač mikrojažica je inkubiran 20 minuta pri sobnoj temperaturi i zatim je sadržaj mikrojažica ispražnjen, a njihov sadržaj je ispran puferom za ispiranje pet puta. Nakon ispiranja sadržaj mikrojažica je, tapkanjem u nekoliko slojeva staničevine, osušen te je zaostala tekućina uklonjena. Tada je otpipetirano 100 μ L konjugata (antitijela konjugirana enzimima). Slijedila je inkubacija pri sobnoj temperaturi 20 minuta, nakon čega je sadržaj mikrojažica ispražnjen te su jažice isprane pet puta kao ranije. Nakon toga otpipetirano je 100 μ L supstrata i inkubirano u tami pri sobnoj temperaturi 20 minuta. Nakon inkubacije dodano je 100 μ L STOP otopine pri čemu je boja iz plave prešla u žutu. Nosač mikrojažica postavljen je u ELISA čitač s filterom od 450 nm i pokrenut je program na računalu te očitana apsorbancija. Koncentracija kikirikija u uzorcima određena je na osnovi predhodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda kikirikija (Slika 7).



Slika 7. Baždarni dijagram standarda kikirikija

3.2.4. Obrada podataka

Dobiveni rezultati obrađeni su pomoću programa Microsoft Office Excel 2019. Za obradu podataka korištene su standardne metode deskriptivne statistike.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ovim istraživanjem ELISA metodom određeni su potencijalni alergeni kikirikija u 8 uzoraka žitarica za doručak s čokoladom. Četiri analizirana proizvoda pri tome su iz konvencionalne proizvodnje i označeni su kodovima KŽ₁, KŽ₂, KŽ₃, KŽ₄, a ostala četiri proizvoda su iz organske proizvodnje, te su označeni kodovima OŽ₁, OŽ₂, OŽ₃, OŽ₄. Dobiveni rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija prikazani su u tablicama 2. i 4., dok su navodi o mogućoj prisutnosti alergena na deklaracijama analiziranih proizvoda navedeni u tablicama 3. i 5.

Za kvantifikaciju alergena kikirikija korišten je set za ELISA test *Agraquant Peanut Assay*, (Romer Labs, Austrija). Za ovaj ELISA set nisu zabilježene križne reakcije sa drugim sastojcima hrane, a limit detekcije je 0,1 mgkg⁻¹.

Tablica 2. Udio alergena kikirikija (mgkg⁻¹) u uzorcima žitarica za doručak iz konvencionalne proizvodnje

Uzorak	Udio alergena kikirikija [mgkg⁻¹] (srednja vrijednost ± standardna devijacija)
KŽ₁	0,42 ± 0,001
KŽ₂	1,06 ± 0,002
KŽ₃	0,43 ± 0,001
KŽ₄	0,25 ± 0,001
Prosjek	0,54

Prisutnost alergena kikirikija detektirana je u sva četiri uzorka žitarica za doručak s čokoladom iz konvencionalne proizvodnje. Raspon udjela alergena kikirikija kreće se od 0,25 do 1,06 mgkg⁻¹, prosječno 0,54 mgkg⁻¹. Najviši je udio kikirikija (1,06 mgkg⁻¹) određen u uzorku KŽ₂ iako taj proizvod, kao ni ostali analizirani proizvodi, ne sadrži navod o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija na deklaraciji, odnosno u okviru informacija o hrani (Tablica 3).

Tablica 3. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka žitarica za doručak iz konvencionalne proizvodnje, a koji se odnose na mogući sadržaj alergena

Uzorak	Navod vezan uz sadržaj alergena
KŽ ₁	„Može sadržavati drugo orašasto voće i soju“
KŽ ₂	„Može sadržavati tragove lješnjaka i oraha“
KŽ ₃	„Proizvod može sadržavati sezam i orašaste plodove u tragovima“
KŽ ₄	„Može sadržavati drugo orašasto voće i soju“

Alergeni kikirikija detektirani su također u sva četiri uzorka žitarica za doručak s čokoladom iz organske proizvodnje, pri čemu se udio kreće u rasponu od 0,16 do 0,28 mgkg⁻¹, dok prosječna vrijednost iznosi 0,26 mgkg⁻¹. Niti jedan analizirani proizvod žitarica za doručak iz organske proizvodnje u okviru informacija o hrani ne sadrži navod o potencijalnoj prisutnosti alergena kikirikija (Tablica 4).

Tablica 4. Udio alergena kikirikija (mgkg⁻¹) u uzorcima žitarica za doručak iz organske proizvodnje

Uzorak	Udio alergena kikirikija [mgkg ⁻¹] (srednja vrijednost ± standardna devijacija)
OŽ ₁	0,31 ± 0,001
OŽ ₂	0,27 ± 0,001
OŽ ₃	0,28 ± 0,000
OŽ ₄	0,16 ± 0,001
Prosjek	0,26

Tablica 5. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka žitarica iz organske proizvodnje, a koji se odnose na mogući sadržaj alergena

Uzorak	Navod vezan uz sadržaj alergena
OŽ ₁	„Može sadržavati gluten, orašasto voće i sezam u tragovima“
OŽ ₂	„Može sadržavati orašasto voće i sezam u tragovima“
OŽ ₃	„Može sadržavati orašasto voće/orašaste plodove u tragovima“
OŽ ₄	„Proizvod može sadržavati tragove zobi, kakaa i pšeničnih proizvoda“

Označavanje hrane najučinkovitija je metoda zaštite osoba s nutritivnom alergijom od slučajne konzumacije proizvoda sa prisutnim alergenima. Za one alergene koji nisu sastojci proizvoda, a koji se mogu naći u proizvodu radi nenamjerne kontaminacije navođenje je dobrovoljno (Uredba EU, 2011). Proizvođači koji ne mogu jamčiti da proizvod ne sadrži neke od najčešćih alergena često koriste navode o mogućoj prisutnosti alergena kako bi zaštitili potrošače (Van Hengel, 2007). Većina proizvoda analiziranih tijekom ovog istraživanja sadrži navod o mogućoj prisutnosti orašastog voća. Međutim, kikiriki se ne ubraja u skupinu orašastog voća već u skupinu leguminoza, pa se navod o potencijalnim tragovima orašastog voća ne odnosi na kikiriki.

Žitarice za doručak su popularan izbor među svim dobnim skupinama. Čak 54,4 % djece redovito konzumira žitarice za doručak kao i 16 % odraslih iznad 18 godina (Smith, 2003). Istraživanje provedeno u Australiji pokazalo je kako osobe između 19 i 30 godina konzumiraju žitarice za doručak u količini od 34 do 102 g, iako je preporučena količina za serviranje najčešće 40 g (Zheng i sur., 2016).

Količine proteina kikirikija koje izazivaju alergijsku reakciju kod pojedinaca s alergijom na kikiriki variraju od osobe do osobe a kreću se u rasponu od 0,3 mg do 1000 mg. Kod osjetljivih pojedinaca čak i jako niske koncentracije proteina kikirikija od 0,1 mg mogu izazvati alergijsku reakciju (Wensing i sur., 2002; Koppelman i sur., 2004), što ukazuje na značaj analitičkog praćenja udjela alergena u prehrambenim proizvodima te informiranja potrošača.

5. ZAKLJUČAK

1. Alergeni kikirikija su imunoenzimskom ELISA metodom detektirani u svim analiziranim uzorcima žitarica za doručak.
2. Udio alergena kikirikija se u uzorcima žitarica za doručak iz konvencionalne proizvodnje (n=4) kretao u rasponu od od 0,25 do 1,06 mgkg⁻¹, a u uzorcima žitarica za doručak iz organske proizvodnje (n=4) u rasponu od 0,16 do 0,28 mgkg⁻¹.
3. U uzorcima žitarica za doručak iz konvencionalne proizvodnje je detektiran viši prosječan udio (0,54 mgkg⁻¹) alergena kikirikija u odnosu na uzorke žitarica za doručak iz organske proizvodnje (0,26 mgkg⁻¹), a najviši udio potencijalnih alergena kikirikija (1,06 mgkg⁻¹) detektiran je u jednom od uzoraka (KŽ₂) žitarica za doručak iz konvencionalne proizvodnje. Analizirani proizvodi u okviru deklaracija, odnosno informacija o hrani, nisu sadržavali navode o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija.

6. LITERATURA

Akiyama H., Imai T., Ebisawa M. (2011) Japan food allergen labeling regulation-history and evaluation. *Advances in Food and Nutrition Research* **62**: 139-171.

Anonymous (2015) ELISA - Principle, Types and Applications, <<http://www.microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications>>. Pristupljeno 01. lipnja 2019.

Arya S. S., Salve A. R., Chauhan S. (2016) Peanuts as functional food: a review. *Journal of Food Science and Technology* **53(1)**: 31–41.

Ball H., Luyt D., Bravin K., Kirk K. (2011) Single nut or total nut avoidance in nut allergic children: outcome of nut challenges to guide exclusion diets. *Pediatric Allergy and Immunology* **22(8)**: 808-812.

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. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **107(6)**: 1077-81.

Blanc F., Vissers Y. M., Adel-Patient K., Rigby N.M., Mackie A.R, Gunning A. P., Wellner N. K., Skov P. S., Przybylski-Nicaise L., Ballmer-Weber B., Zuidmeer-Jongejan L., Sze ´ pfalusi Z., Ruinemans-Koerts J., Jansen P. H., Bernard H., Wal J.-M., Savelkoul H. F. J., Wichers H. J., Mills E. N. C. (2011) Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity. *Molecular Nutrition & Food Research* **55**: 1887–1894.

Bošnjir J., Colić Barić I., Ćurić D., Mandić M., Pollak L., Teklić T., Valek M. (2009) Alergije podrijetlom iz hrane, Hrvatska agencija za hranu (HAH): 6-16.

Bucchini L., Guzzon A., Poms R., Senyuva H. (2016) Analysis and critical comparison of food allergen recalls from the European Union, USA, Canada, Hong Kong, Australia and New Zealand. *Food Additives & Contaminants Part A* **33(5)**: 760-771.

Butorac A., Marić M., Sabolović M.B., Hruškar M., Brnčić S.R., Družina V.B. (2013) Pregledni rad: Analitičke metode u forenzici hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8 (3-4)**: 90-101.

Careri M., Costa A., Elviri L., Lagos J.-B., Mangia A., Terenghi M., Cereti A., Perono Garoffo L. (2007) Use of specific peptide biomarkers for quantitative confirmation of hidden allergenic peanut proteins Ara h2 and Ara h3/4 for food control by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**: 1901–1907.

Comstock S. S., Maleki S. J., Teuber S. S., (2016) Boiling and frying peanuts decreases soluble peanut (*Arachis hypogaea*) allergens Ara h 1 and Ara h 2 but does not generate hypoallergenic peanuts. *PLOS One* **11**.

FDA– Food and Drug Administration (2004) Food Allergen Labeling And Consumer Protection Act <www.fda.gov> Pristupljeno 1.lipnja 2019.

García A., Madrid R., García T., Martín R., González I. (2017) Detection of Food Allergens by Taqman Real-Time PCR Methodology. *Methods in Molecular Biology* **1592**: 95-108.

Gupta R. K., Gupta K., Sharma A., Das M., Ansari I. A., Dwivedi P. D. (2018) Maillard reaction in food allergy: Pros and cons, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **58**: 208-226.

Hefle S. L., Bush R. K., Yunginger J. W., Chu F. S. (1994) A Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Quantitation of Selected Peanut Proteins in Foods. *Journal of Food Protection* **57(5)**: 419-423.

Hefle S. L., Furlong T. J., Niemann L., Lemon-Mule H., Sicherer S., Taylor S. L. (2007) Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labeling regarding the presence of peanuts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120(1)**: 171-176.

Heick J., Fischer M., Pöpping B. (2011) First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography* **1218(7)**: 938-943.

Heine R. G. (2015) Food Intolerance and Allergy. U: Pediatric Nutrition in Practice, 2. izd., Koletzko B., ur., World Review of Nutrition and Dietetics, Basel, Karger, vol 113, str. 195 – 202.

Hirst B. (2014) Final report: Survey of allergen advisory labelling and allergen content of UK retail pre-packed processed foods. *RSSL*: 1-94.

Katalenić S. (2007) Alergeni u hrani – zakonodavstvo i obveze proizvođača. *Hrana i zdravlje* **3(9)**: 1- 4.

Keck-Gassenmeier B., Benet S., Rosa C., Hischenhuber C. (1999) Determination of Peanut Traces in Food by a Commercially-available ELISA Test, *Food and Agricultural Immunology* **11**: 243-250.

Kolaček S. (2011) Preosjetljivost na hranu u dječjoj dobi. *Acta Medica Croatica* **65**: 155 –161.

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. *Clinical & Experimental Allergy* **34**: 583–590.

Koppelman, S., Hefle, S. (2006) Detecting Allergens in Food. Woodhead, Cambridge

Maleki S. J., Chung S.-Y., Champagne E. T., Raufman J.-P. (2000) The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **106(4)**: 763-768.

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

Mikita C. P., Padlan E. A. (2012) Can we explain the allergenicity of peanuts on the basis of the three-dimensional structure of its allergens and use the information to devise means of eliminating peanut allergy? *Medical Hypotheses* **79**: 585–591.

Mills E. N. C., Valovirta E., Madsen C., Taylor S. L., Vieths S., Anklam E., Baumgartner S., Koch P., Crevel R. W. R., Frewer L. (2004) Information provision for allergic consumers – where are we going with food allergen labelling? *Allergy* **59**: 1262–1268.

Mills E. N., Sancho A. I., Rigby N. M., Jenkins J. A., Mackie A. R. (2009) Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**: 963–969.

NIH-National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2017) Addendum Guidelines for the prevention of peanut allergy in The United States: Report of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases < www.niaid.nih.gov > Pristupljeno 1. lipnja 2019.

O’B Hourihane J., Roberts S. A., O Warner J. (1998) Resolution of peanut allergy: case-control study. *British Medical Journal* **316**: 1271-1275.

Orhan F., Karakas T., Cakir M., Aksoy A., Baki A., Gedik Y. (2009) Prevalence of immunoglobulin E-mediated food allergy in 6-9-year-old urban schoolchildren in the eastern Black Sea region of Turkey. *Clinical & Experimental Allergy* **39(7)**.

Osborne N. J., Koplin J. J., Martin P. E., Gurrin L. C., Lowe A. J., Matheson M. C., Ponsonby A. L., Wake M., Tang M. L., Dharmage S. C., Allen K. J. (2011) Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **127**: 668–676 .

Palladino C., Breiteneder H. (2018) Peanut allergens. *Molecular Immunology* **100**: 58–70.

Petersen A., Kull S., Rennert S., Becker W. M., Krause S., Ernst M., Gutschmann T., Bauer J., Lindner B., Jappe U. (2015) Peanut defensins: novel allergens isolated from lipophilic peanut extract. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **136(5)**: 1295–1301.

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

Prado M., Ortea I., Vial S., Rivas J., Calo-Mata P., Barros-Velázquez J. (2016) Advanced DNA- and Protein-based Methods for the Detection and Investigation of Food Allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **56**: 2511-2542.

Prescott S. L. , Pawankar R., Allen K. J., Campbell D. E., Sinn J. K. H. , Fiocchi A., Ebisawa M., Sampson H. A., Beyer K , Lee B.-W. (2013) A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organization Journal* **6**: 1-21.

RASFF (2018) Rapid Alert System for Food and Feed
<https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2017.pdf >
Pristupljeno 2. lipnja 2019.

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

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

Sampson H.A. (2002) Peanut allergy. *The New England Journal of Medicine* **346**: 1294-1299.

Schappi G. F., Konrad V., Imhof D. ,Etter R., Wuthrich B. (2001) Hidden peanut allergens detected in various foods: findings and legal measures. *Allergy* **56**: 1216–1220.

Schmitt D.A. , Nesbit J. B., Hurlburt B. K., Cheng H., Maleki S. J. (2010) Processing can alter the properties of peanut extract preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **27**: 1138-1143.

Sicherer S. H., Sampson H. A. (2006) Food Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **117**: 470-475.

Smith A.P. (2003) Breakfast Cereal Consumption and Subjective Reports of Health by Young Adults. *Nutritional Neuroscience* **6(1)**: 59-61.

Szilagyi A., Ishayek N. (2018) Review: Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. *Nutrients* **10**: 1-30.

Tang R.-B., Chang J.-K., Chen H.-L. (2015) Can probiotics be used to treat allergic diseases? *Journal of the Chinese Medical Association* **78**: 154-157.

Taylor S. B., Christensen G., Grinter K., Sherlock R., Warren L. (2018) The Allergen Bureau VITAL Program. *Journal of AOAC International* **101(1)**: 77-82.

The WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-committee (2019) <www.allergen.org> Pristupljeno 27. svibnja 2019.

Toit G. D., Katz Y., Sasieni P., Mesher D., Maleki S. J., Fisher H. R., Fox A. T., Turcanu V., Amir T., Zadik-Mnuhin G., Cohen A., Livne I., Lack G. (2008) Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **122(5)**: 984-991.

Toit G. D., Roberts G., Sayre P. H., Bahnson H. T., Radulovic S., Santos A. F., Brough H. A., Phippard D., Basting M., Feeney M., Turcanu V., Sever M. L., Lorenzo M. G., Plaut M., Lack G. (2015) Randomized Trial of Peanut Consumption in Infants at Risk for Peanut Allergy. *The New England Journal of Medicine* **372**: 803-813.

Tran D.T., Knez K., Janssen K.P., Pollet J., Spasic D., Lammertyn J. (2013) Selection of aptamers against Ara h 1 protein for FO-SPR biosensing of peanut allergens in food matrices. *Biosensors and Bioelectronics* **15**: 245-251.

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

Umetsu D. T., Rachid R., Schneider L. C. (2015) Oral immunotherapy and anti-IgE antibody treatment for food allergy. *World Allergy Organization Journal* **8**: 1-5.

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

Van Hengel A. J. (2007) Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**: 111–118.

Vanga S. K, Singh A., Raghavan V. (2017) Review of conventional and novel food processing methods on food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**: 2077-2094.

Wensing M., Penninks A. H., Hefle S. L. ,Koppelman S. J, Bruijnzeel-Koomen C. A. F. M., Knulst A. C. (2002) The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110(6)**: 915-920.

Yeung J. M., Collins P. G. (1996) Enzyme immunoassay for the determination of peanut proteins in food products. *Journal of AOAC International* **79**: 1411–1416.

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. *Journal of Food Protection* **46**: 625–628

Zhang W., Zhu Q., Zhang T., Cai Q., Chen Q. (2016) Thermal processing effects on peanut allergen Ara h 2 allergenicity in mice and its antigenic epitope structure. *Food Chemistry* **212**: 657-662.

Zheng M, Wu J. H. Y., Yu Louie J. C. Y., Flood V. M., Gill T., Thomas B., Cleanthous X., Neal B., Rangan A. (2016) Typical food portion sizes consumed by Australian adults: results from the 2011–12 Australian National Nutrition and Physical Activity Survey. *Scientific Reports* **6**.

Ziyab A.H. (2019) Prevalence of food allergy among schoolchildren in Kuwait and its association with the coexistence and severity of asthma, rhinitis, and eczema: A cross-sectional study. *World Allergy Organization Journal* **12(4)**.

Zurzolo G. A., Mathai M. L., Koplin J. J., Allen K. J. (2013) Precautionary allergen labelling following new labelling practice in Australia. *Journal of Paediatrics and Child Health* **49**: 306–310.

Izjava o izvornosti

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

Nikola Udubić

ime i prezime studenta