

Određivanje alergena kikirikija u različitim prehrambenim proizvodima imunoenzimskom metodom

Herceg, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:159:042593>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

Iva Herceg

**ODREĐIVANJE ALERGENA KIKIRIKIJA U
RAZLIČITIM PREHRAMBENIM
PROIZVODIMA IMUNOENZIMSKOM
METODOM**

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

ODREĐIVANJE ALERGENA KIKIRIKIJA U RAZLIČITIM PREHRAMBENIM PROIZVODIMA IMUNOENZIMSKOM METODOM

Iva Herceg, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058215334

Sažetak: Kikiriki (*Arachis hypogaea*) se ubraja u najčešće nutritivne alergene, snažne alergene aktivnosti. Cilj ovog istraživanja bio je primjenom ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metode odrediti udio alergena kikirikija u različitim prehrambenim proizvodima, te usporediti analitičke rezultate s informacijama o hrani. Obzirom da je u objektima javne prehrane isticanje alergena otežano, provedena je i analiza jelovnika dostupnih na mrežnim stranicama objekata javne prehrane kao što su restorani. Alergeni kikirikija detektirani su u 19 od 20 nepretpakiranih uzoraka sladoleda, žitarica za doručak, kolača, kekisa i čajnih peciva te gotovih jela pri čemu informacije o hrani nisu sadržavale informacije vezane uz prisutnost alergena kikirikija, osim kod jednog uzorka. Između 20 analiziranih pretpakiranih uzoraka, alergeni kikirikija detektirani su u 19 pri čemu je 14 uzoraka sadržavalo informaciju o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija. Najviši prosječan udio alergena kikirikija je određen u uzorcima kekisa i čajnih peciva ($2,45 \text{ mgkg}^{-1}$), a najniži u uzorcima sladoleda ($0,95 \text{ mgkg}^{-1}$).

Ključne riječi: alergeni, kikiriki, ELISA metoda, pretpakirana hrana, nepretpakirana hrana

Rad sadrži: 53 stranice, 10 slika, 15 tablica, 105 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Marković

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Nada Vahčić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Marković (mentor)
3. prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (član)
4. prof. dr. sc. Draženka Komes (zamjenski član)

Datum obrane: 20. rujan 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

DETERMINATION OF PEANUT ALLERGENS IN VARIOUS FOOD PRODUCTS BY IMMUNOENZYME METHOD

Iva Herceg, univ. bacc. ing. techn. aliment., 0058215334

Abstract: Peanut (*Arachis hypogaea*) is one of the most common nutritional allergens, with strong allergenic activity. The aim of this research was to use the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method to determine the proportion of peanut allergens in different food products, and to compare the analytical results with food information. Given that highlighting allergens is difficult in public food establishments, an analysis of the menus available on the websites of the public food establishments such as restaurants was also carried out. Peanut allergens were detected in 19 out of 20 non-prepackaged samples of ice cream, breakfast cereals, cakes, biscuits and tea pastries, and ready meals, where the food information did not contain information related to the presence of peanut allergens, except for one sample. Among the 20 analysed prepackaged samples, peanut allergens were detected in 19 of which 14 samples contained information about the possible presence of peanut allergens. The highest average proportion of peanut allergen was determined in samples of biscuits and tea cakes (2.45 mgkg^{-1}), and the lowest in samples of ice cream (0.95 mgkg^{-1}).

Keywords: allergens, peanuts, ELISA method, prepackaged food, non-prepackaged food

Thesis contains: 53 pages, 10 figures, 15 tables, 105 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Ksenija Marković, Full professor

Reviewers:

1. Nada Vahčić, PhD, Full professor (president)
2. Ksenija Marković, PhD, Full professor (mentor)
3. Ines Panjkota Krbavčić, PhD, Full professor (member)
4. Draženka Komes, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 20th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PREHRAMBENE ALERGIJE	2
2.2. KIKIRIKI	2
2.2.1. Općenito o kikirikiju.....	2
2.2.2. Alergeni kikirikija.....	3
2.2.3. Alergijska reakcija na kikiriki	5
2.3. METODE ZA ODREĐIVANJE ALERGENA KIKIRIKIJA	7
2.3.1. Imunoanalitičke metode.....	7
2.3.2. Molekularno-genetske metode.....	8
2.4. ELISA METODA	9
2.4.1. Općenito o ELISA metodi.....	9
2.4.2. Vrste ELISA metoda	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJAL	15
3.1.1. Uzorci	15
3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor	15
3.1.4. Kemikalije i reagensi.....	17
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Priprema reakcijskih otopina.....	18
3.2.2. Priprema uzoraka za analizu	18
3.2.3. ELISA metoda	19
3.2.4. Analiza jelovnika dostupnih na mrežnim stranicama objekata javne prehrane	20
3.2.5. Obrada podataka.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA SLADOLEDA, ŽITARICA ZA DORUČAK I SLASTICA	21
4.2. UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA GOTOVIH JELA	34
4.3. ANALIZA PRUŽANJA INFORMACIJA POTROŠAČIMA O ALERGENIMA KIKIRIKIJA U NEPRETPAKIRANOJ HRANI	42
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

Alergije na hranu predstavljaju sve značajniji zdravstveni problem u razvijenim zemljama, čineći veliki izazov za medicinsku struku i prehrambenu industriju tijekom posljednjih nekoliko desetljeća. Prevalencija alergija na hranu procjenjuje se na 3 % do 5 % kod odraslih, dok je kod djece taj postotak viši, dosežući 8 % na globalnoj razini. Ključna strategija za prevenciju alergijskih reakcija kod osjetljivih pojedinaca uključuje striktno izbjegavanje alergena, što zahtijeva dostupnost točnih i detaljnih informacija o sastojcima hrane. Ipak, skriveni alergeni mogu predstavljati dodatnu opasnost, često prisutni u hrani zbog različitih faktora, uključujući križnu kontaminaciju.

Kikiriki (*Arachis hypogaea*) je među 14 glavnih alergena koji su obavezni za označavanje na ambalaži prema Uredbi (EU) br. 1169/2011. Ovaj alergen je iznimno prisutan u globalnoj populaciji, s prevalencijom između 0,6 % i 2,9 %, te je poznat po svojoj snažnoj alergenoj aktivnosti. Zbog svoje alergenosti, kikiriki može izazvati ozbiljne, po život opasne reakcije, poput anafilaktičkog šoka.

Sve veći broj slučajeva alergija na hranu, posebno na proteine kikirikija, zahtijeva poboljšane mjere kontrole u proizvodnim procesima kako bi se smanjila mogućnost križne kontaminacije. Osim toga, informiranje potrošača putem jasnih i točnih deklaracija na ambalaži od presudne je važnosti za sigurnost osoba koje pate od alergija. Proizvođači hrane sve više ulažu u razvoj mjera za sprečavanje križnog kontakta alergena, koristeći namjenske proizvodne linije ili objekte. Međutim, čak i uz ove mjere, ostaje izazov pružanja pouzdanih informacija o potencijalnoj prisutnosti alergena u proizvodima.

U prehrambenoj industriji, ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metoda se često koristi za detekciju alergena, uključujući kikiriki. Cilj ovog istraživanja bio je primjenom ELISA metode odrediti udio alergena kikirikija u 40 različitih uzoraka uključujući nepretpakirane uzorke iz slastičarnica i objekata javne prehrane kao što su restorani, te pretpakirane uzorke iz trgovačkih lanaca (sladoled, n = 8; žitarice za doručak, n = 8; kolači, n = 8; keksi i čajna peciva, n = 8; gotova jela, n = 8), te usporediti analitičke rezultate s informacijama o hrani analiziranih uzoraka. Obzirom da je u objektima javne prehrane isticanje alergena otežano, tijekom ovog istraživanja dodatno su analizirani jelovnici dostupni na mrežnim stranicama objekata javne prehrane, te na taj način pružene informacije potrošačima o alergenima kikirikija u nepretpakiranoj hrani.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PREHRAMBENE ALERGIJE

Prehrambene alergije nastaju zbog nemogućnosti organizma da razvije imunološku toleranciju na određene sastojke iz hrane (Taylor, 2006), koje imunološki sustav prepoznaje kao strane tvari, odnosno alergene, pokrećući obrambenu reakciju. Osam glavnih alergena odgovorno je za većinu alergijskih reakcija: mlijeko, jaja, kikiriki, orašasti plodovi, školjke, pšenica, soja i riba, no mogu ih uzrokovati i druge namirnice poput sezama, celera, mesa i raznih vrsta voća i povrća (Muthukumar i sur., 2020).

IgE-posredovane alergije su najčešći oblik, pri čemu se simptomi mogu pojaviti unutar nekoliko minuta do dva sata nakon izlaganja alergenu. Simptomi uključuju kožne reakcije, gastrointestinalne probleme te respiratorne poteškoće, dok najteži oblik, anafilaksija, zahtijeva hitnu medicinsku intervenciju (Robinson, 2012). Za razliku od alergija, intolerancije na hranu ne uključuju imunološki odgovor, kao što je slučaj s intolerancijom na laktozu, gdje se smanjen unos problematične hrane može tolerirati (Muthukumar i sur., 2020).

Sve češća pojava alergija, posebno među djecom, može biti povezana s nasljednim faktorima i okolišnim utjecajima, a hipoteza o higijeni sugerira da nedovoljna izloženost alergenima u ranoj dobi povećava rizik od razvoja alergija (Burks, 2008). Ograničeni izbor hrane kod alergičnih osoba može dovesti do nutritivnih deficita, a mentalno zdravlje može biti ugroženo zbog osjećaja socijalne izolacije i anksioznosti (Mazzocchi i sur., 2017). Izbjegavanje alergena ključna je mjera za osobe s dijagnosticiranim alergijama, a pravilno označavanje hrane bitan je faktor u prevenciji slučajnog izlaganja (Uredba, 2011).

Rizik od kontaminacije hrane alergenima postoji u restoranima i proizvodnim pogonima, a oznake poput "može sadržavati tragove" često zbunjuju potrošače, što može ograničiti njihov izbor i izazvati anksioznost (Ford i sur., 2010). Standardizacija i poboljšanje označavanja alergena ključno je za zaštitu potrošača (Skypala i McKenzie, 2019).

Neke od najčešćih alergija kod odraslih su one na ribu, kikiriki i orašaste plodove, dok su kod djece najčešće alergije na mlijeko i jaja, koje se obično pojavljuju do šeste godine života (Kolaček i sur., 2016).

2.2. KIKIRIKI

2.2.1. Općenito o kikirikiju

Kikiriki (lat. *Arachis hypogea* L.), poznat kao arahid ili zemno orašće, je jednogodišnja biljka koja pripada porodici *Leguminosae* (mahunarke) koja uključuje biljke poput graška, leće, soje i graha. Izvorno je iz Južne Amerike, a španjolski istraživači su ga donijeli u Europu, odakle se proširio diljem svijeta (Levetin i McMahon, 2008). Do početka 18. stoljeća stigao je u Sjedinjene

Američke Države, koje su danas treće po proizvodnji kikirikija na svjetskoj razini sa 6 % ukupne proizvodnje. Kina i Indija drže prva dva mjesta s 40 % i 25 % proizvodnje (Car, 2017).

Kikiriki je grmolika biljka koja naraste između 30 i 50 cm u visinu. Cvjetovi se razvijaju iznad zemlje, ali se zbog težine savijaju i ulaze u tlo gdje formiraju mahune. Mahune su svijetlosmeđe boje i sadrže od jednog do četiri ovalna zrna prekrivena crveno-smeđom tankom kožicom. Ova biljka uspijeva na sunčanim i toplim područjima s umjerenim oborinama, a za klijanje joj je potrebna temperatura od 21 °C. Cvjetanje traje 30 do 40 dana, a od sjetve do berbe prođe 4 do 5 mjeseci. U vrijeme berbe, plodovi sadrže oko 50 % vlage te se suše na 10 % vlage. Oljuštene sjemenke kikirikija imaju oko 28 % proteina i 18 % ugljikohidrata te sadrže 567 kcal na 100 g, što ih čini bogatim izvorom energije. Kikiriki je bogat mononezasićenim masnim kiselinama, vitaminima B skupine i vitaminom E, kao i magnezijem i vlaknima. Najpoznatije sorte su *Spanish*, *Runner*, *Virginia* i *Valencia Certain*, koje se razlikuju po okusu, sadržaju ulja, veličini i obliku sjemena te se koriste za različite proizvode (Car, 2017).

Ulje kikirikija, koje čini 40-50 % njegove mase, sadrži oko 80 % nezasićenih masnih kiselina. Istraživanja su pokazala da, unatoč ranijim tvrdnjama o štetnosti kikirikijeva ulja, ono može imati pozitivne učinke na ljudsko zdravlje i smanjiti rizik od kardiovaskularnih bolesti (Kris-Etherton i sur., 2008).

Oko dvije trećine svjetske proizvodnje kikirikija koristi se za proizvodnju ulja i maslaca od kikirikija, dok se ostatak koristi za proizvodnju grickalica i slatkiša. Kikiriki maslac, koji potječe iz 1890-ih godina u Sjedinjenim Američkim Državama, razvijen je kao hranjiv i lako probavljiv proizvod za bolesnike s problemima žvakanja (Levetin i McMahon, 2008).

2.2.2. Alergeni kikirikija

Glavni alergeni kikirikija su proteini kotiledona, a identificirano je 8 alergena kikirikija; Ara h 1 - Ara h 8 (Husain i Schwartz, 2013), čije strukture su prikazane na slici 1. Sjemenke kikirikija u prosjeku sadrže 29 % proteina (Freeman i sur., 1954). Oko 20 % tog proteina čini glavni alergen Ara h 1, dok Ara h 2 čini oko 10 % (Koppelman i sur., 2001; Burks i sur., 1998). Ara h 1 i Ara h 2 prepoznaje 70-90 % ljudi s alergijom na kikiriki, dok Ara h 3 prepoznaje 44-54 % oboljelih (Kang i sur., 2007).

Ara h 1 je glikoprotein molekulske mase 63,5 kDa i izoelektrične točke (pI) 4,55. DNK analiza pokazala je sličnost s vicilinom, skladišnim proteinom. Ara h 1 tvori stabilnu trimernu strukturu putem hidrofobnih interakcija i sadrži 23 linearna epitopa vezana za IgE, od kojih su epitopi 1, 3, 4 i 17 imunodominantni. Promjene u aminokiselinama unutar ovih epitopa mogu značajno utjecati na vezanje IgE (Wen i sur., 2007). Ara h 1 je stabilan na toplinu, bez križne kontaminacije s drugim mahunarkama, što ga čini idealnim biomarkerom za detekciju alergena kikirikija (Pomès i sur., 2003).

Ara h 2 je glikoprotein mase 17 kDa i pl 5,2. Sadrži 8 cisteinskih ostataka koji formiraju 4 disulfidne veze, što doprinosi stabilnosti proteina. Ara h 2 djeluje kao slabi inhibitor tripsina i štiti Ara h 1 od degradacije. Toplinska obrada povećava stabilnost i alergijska svojstva Ara h 2 (Maleki i sur., 2003).

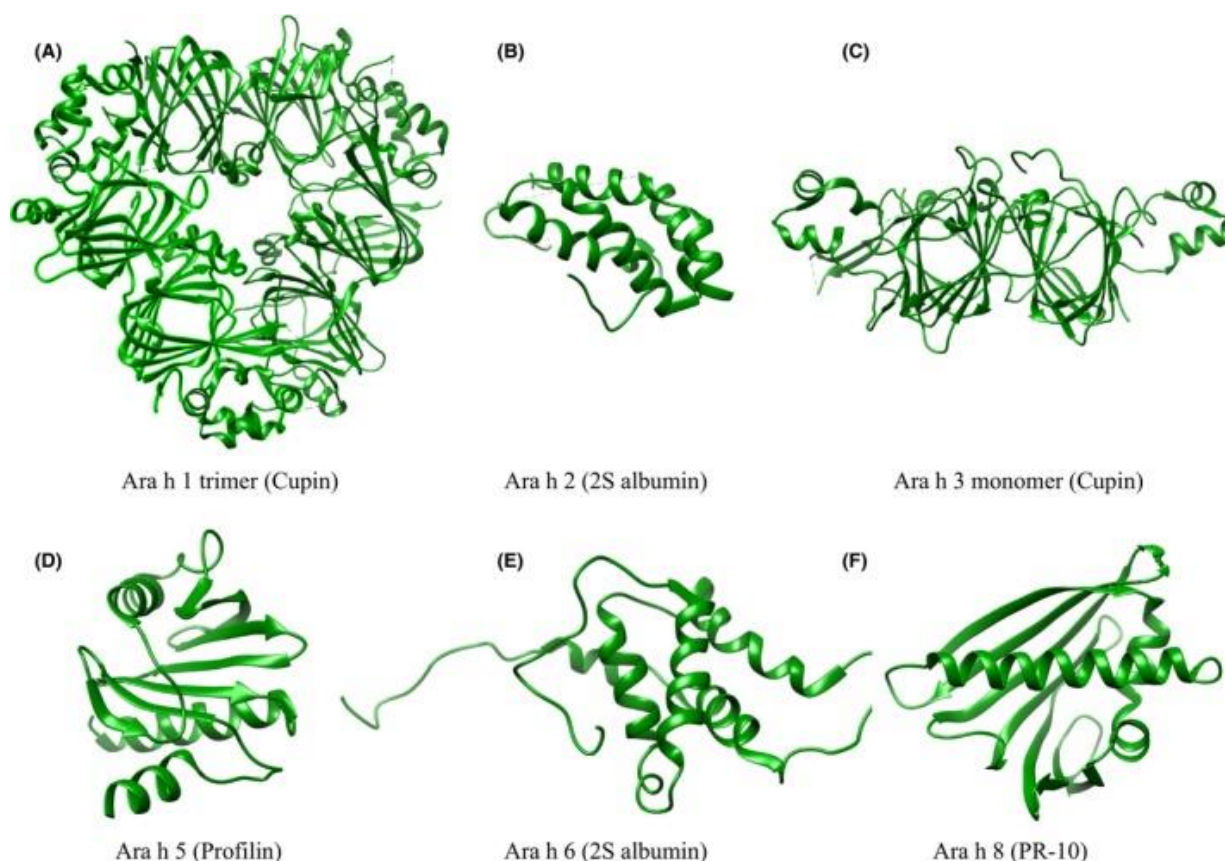
Ara h 3 je protein mase 57 kDa, homologan glicininima iz soje, što može dovesti do križnih reakcija s drugim mahunarkama (Mikita i sur., 2012).

Ara h 4, s molekulskom masom od 61 kDa i pl 5,2, pokazuje visoku homologiju s Ara h 3 i prisutan je u 53 % ljudi s alergijom na kikiriki (Wen i sur., 2007).

Ara h 5 je profilin molekulske mase 14 kDa i pl 4,6, rijetko izaziva alergijske reakcije, no može biti uključen u križne reakcije s peludom breze, trave i pšenice (Wen i sur., 2007).

Ara h 6 i Ara h 7, mase 14,5 kDa i 15,8 kDa, slični su kolutinskim proteinima. Njihova stabilnost nakon probave i toplinske obrade sugerira njihov potencijal kao alergena (Suhr i sur., 2004).

Ara h 8, mase 16,9 kDa i pl 5,03, može izazvati križne reakcije s Bet v1, glavnim peludnim alergenom breze (Wen i sur., 2007).



Slika 1. Vrpčasti prikazi dostupnih struktura alergena kikirikija. (A) Ara h 1 (pristupni broj Banke podataka o proteinima 3SMH), (B) Ara h 2 (PDB 3OB4), (C) Ara h 3 (PDB 3C3V), (D) Ara h 5 (PDB 4ESP), (E) Ara h 6 (PDB 1W2Q), (F) Ara h 8 (PDB 4M9B). Slike su stvorene sustavom molekularnog modeliranja UCSF Chimera (Ozias-Akins i Breiteneder, 2019)

2.2.3. Alergijska reakcija na kikiriki

Unatoč velikoj popularnosti kikirikija, postoje dva glavna sigurnosna problema povezana s njegovom konzumacijom. Prvi problem je kontaminacija aflatoksinom, kancerogenom tvari koju proizvode plijesni *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* (Yu i sur., 2003), no pravilnim skladištenjem i rukovanjem može se u potpunosti eliminirati rizik od kontaminacije ovim toksinima (Boutrif, 1995).

Drugi problem je alergenost kikirikija. Alergijska reakcija na kikiriki (slika 2) se odvija najčešće kroz nekoliko koraka: prezentacija antigena, proizvodnja IgE antitijela, aktivacija mastocita, otpuštanje medijatora upale te na kraju ispoljavanje simptoma (Lehrer i sur., 1996). Kada B stanice imunološkog sustava prvi put stupe u kontakt s alergenom, stvaraju antitijela (najčešće imunoglobuline E), koja se vežu na mastocite i na taj način stvaraju stanice osjetljive na dotični alergen. Prilikom sljedećeg izlaganja, alergen se veže za IgE molekule na mastocitima, pokrećući signalnu kaskadu koja vodi aktivaciji mastocita. Aktivirani mastociti otpuštaju sadržaj svojih granula (histamin), citokine i lipidne medijatore, koji uzrokuju kliničke manifestacije alergijskih reakcija. Histamin, koji nastaje dekarboksilacijom histidina, može izazvati različite upalne procese, svrbež te kontrakcije glatkog mišićja krvnih žila, probavnog i dišnog sustava. Ostali važni medijatori upale uključuju prostaglandine, leukotriene i citokine (Lehrer i sur., 1996).

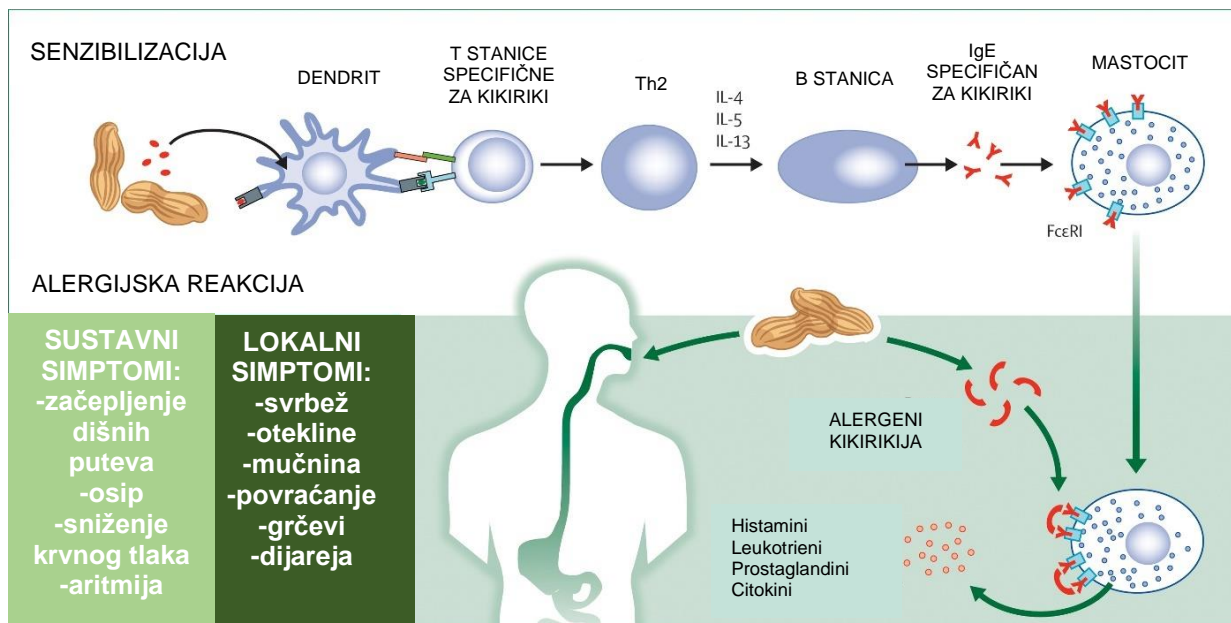
Alergijska reakcija na kikiriki može se javiti odmah nakon izloženosti, uzrokujući različite simptome (Sampson, 2002). U istraživanju sa 662 osobe s alergijom na kikiriki, 76 % je razvilo reakciju unutar 5 minuta (Hourihane i sur., 1997). Simptomi mogu varirati od blagih, poput svrbeža ili bolova u abdomenu, do ozbiljnijih, uključujući stezanje dišnih puteva, sniženje krvnog tlaka, gubitak svijesti, anafilaksiju pa čak i smrt (Benjamini i Leskowitz, 1991). Već i mala količina proteina kikirikija (0,1-1000 mg) može izazvati reakciju (Wensing i sur., 2002). Jedno zrno kikirikija, sadrži oko 200 mg proteina, pa reakciju može izazvati i količina manja od jednog zrna (Goldman, 1998). Alergijska reakcija može biti izazvana i dodiranjem ili ljubljenjem, kao što je zabilježeno kod slučajeva oticanja usana i jezika nakon kontakta s kontaminiranim predmetom (Lepp i sur., 2002). U jednom istraživanju, 2 od 1139 ispitanika imalo je simptome nakon ljubljenja (Eriksson i sur., 2003). Anafilaksija uzrokovana kikirikijem pogađa oko 1,5 milijuna ljudi i uzrokuje 50-100 smrti godišnje u SAD-u (Leung i sur., 2003).

Alergija na kikiriki često se manifestira u ranoj životnoj dobi. Prema podacima, 89 % pojedinaca s alergijom na kikiriki su mlađi od 18 godina, a prva alergijska reakcija se obično javlja u dobi od 14 mjeseci (Sicherer i sur., 2001). Mogući načini razvoja alergije uključuju prenatalnu izloženost te izloženost kroz majčino mlijeko. Preporuča se izbjegavanje kikirikija tijekom trudnoće i dojenja, iako novija istraživanja sugeriraju da rana izloženost alergenima može pomoći u razvoju tolerancije (Young, 2015; Bunyavanich i sur., 2014). Američka akademija za

pedijatriju ne preporučuje uvođenje kikirikija u prehranu djece do treće godine života (Zeiger, 2003). Niža incidencija alergije na kikiriki zabilježena je u zemljama gdje je kikiriki maslac rijetko zastupljen u prehrani (Sampson, 2002). Različiti čimbenici mogu utjecati na razvoj alergije, uključujući genetiku i okoliš, kao i načine pripreme i konzumacije kikirikija; prženi kikiriki je češći uzrok alergijskih reakcija nego kuhani ili prženi u ulju (Husain i Schwartz, 2012; Mondoulet i sur., 2005; Beyer i sur., 2001).

Alergija na kikiriki je najčešće tipična IgE posredovana reakcija, pri kojoj se simptomi mogu pojaviti unutar nekoliko sekundi do dva sata nakon unosa. To je treća najčešća alergija na hranu kod djece i najčešća kod starije djece, adolescenata i odraslih (Sicherer i sur., 1999). Česta je pojava anafilaktičkog šoka sa smrtnim posljedicama (Chen i sur., 2012), a incidencija alergije na kikiriki povećala se u posljednjih deset godina (Kanny i sur., 2001). Strogo izbjegavanje kikirikija i proizvoda koji ga sadrže trenutno je najbolji način sprječavanja alergijskih reakcija, iako je to ponekad teško zbog skrivenih alergena (Barre i sur., 2005). Razlog povećane prevalencije alergije nije u potpunosti poznat, ali se vjeruje da smanjena izloženost specifičnim infekcijama i endotoksinima u ranijoj dobi, kao i rana izloženost alergenima, igraju značajnu ulogu (Nowak-Wegrzyn, 2006).

Alergija na kikiriki jedna je od najčešćih i najopasnijih alergija na hranu, s potencijalno teškim reakcijama koje mogu uključivati anafilaksiju. Zbog visoke prevalencije i ozbiljnosti, prevencija ove alergije postala je ključni cilj u pedijatrijskoj medicini. Rano izlaganje kikirikiju dokazano je učinkovitim metodom prevencije alergije. Prema istraživanjima, uvođenje kikirikija u prehranu dojenčadi između 4 i 11 mjeseca života značajno smanjuje rizik razvoja alergije, posebno kod djece s visokim rizikom (npr. ekcem ili alergija na jaja). Ovaj pristup suprotan je ranijim preporukama koje su savjetovale izbjegavanje potencijalno alergeni namirnica u ranoj dobi. Smjernice stručnih organizacija sada preporučuju rano uvođenje kikirikija, uz prethodnu konzultaciju s pedijatrom ili alergologom, posebno kod djece koja imaju visok rizik od alergije. Postupno uvođenje kikirikija u prehranu, pod nadzorom, može pomoći u stvaranju tolerancije na alergen i smanjenju rizika od budućih alergijskih reakcija. Dijagnostika i nadzor ključni su za pravilnu primjenu ovog preventivnog pristupa. Prije uvođenja kikirikija, djecu s visokim rizikom treba testirati na postojeće alergije. Ako se ustanovi postojanje alergije, potrebno je poduzeti dodatne mjere opreza kako bi se izbjegle ozbiljne reakcije. Ove promjene u pristupu prevenciji alergija na kikiriki značajan su pomak u pedijatrijskoj praksi, pružajući mogućnost za smanjenje incidencije ove teške alergije (Sicherer i Sampson, 2018; Togias i sur., 2017; Du Toit i sur., 2015).



Slika 2. Mehanizam alergijske reakcije na kikiriki (*prema* Burks, 2008)

2.3. METODE ZA ODREĐIVANJE ALERGENA KIKIRIKIJA

Zbog učestale konzumacije namirnica koje sadrže kikiriki, nepravilnog označavanja te kontaminacije sirovina ili proizvodnih linija, postoji rizik pojave tragova kikirikija u hrani u kojoj se to ne očekuje. Ova situacija može biti opasna za osobe koje su alergične na kikiriki (Whitaker i sur., 2005; Koppelman i sur., 1996). Pouzdane metode za detekciju alergena kikirikija nužne su kako bi se osigurala točnost označavanja hrane i poboljšala zaštita potrošača. Međutim, detekcija alergena u hrani može biti izazovna, jer su alergeni često prisutni u vrlo malim količinama i mogu biti maskirani složenom strukturom hrane (Poms i sur., 2004). Općeprihvaćeno mišljenje je da bi granica detekcije za alergene u različitim prehrambenim proizvodima trebala biti između 1 i 100 mgkg⁻¹ (Koppelman i sur., 1996). Uz osjetljivost, specifičnost je također ključna u razvoju analitičkih metoda za detekciju alergena u hrani (Krska i sur., 2004).

2.3.1. Imunoanalitičke metode

Za detekciju potencijalnih alergena kikirikija koriste se različite analitičke metode koje se fokusiraju na proteine kikirikija ili DNA fragmente koji kodiraju te alergene (Wen i sur., 2007). Ove metode mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: metode temeljene na proteinima i metode temeljene na DNA (Koppelman i sur., 1996). Metode temeljene na proteinima omogućuju otkrivanje ukupnog broja proteina kikirikija ili specifičnih alergena. U ovoj kategoriji nalaze se metode kao što su dot-immunološko blotanje (engl. *dot immunoblotting*), "rocket"

imunoelektroforeza (engl. *Rocket Immuno-Electrophoresis*, RIE), imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), radioalergosorbent test (engl. *Radio-Allergosorbent Test*, RAST), radioimunotest (engl. *Radio-Immunoassay*, RIA), imunokromatografski test (engl. *dipsticks*), lateralni protočni test (engl. *Lateral-Flow Immunoassay*, LFIA) te tekućinska kromatografija u kombinaciji s višestrukom spektrometrijom masa (engl. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). Od ovih metoda, dot-imunološko blotanje, imunokromatografski test, RIE i LFIA pružaju kvalitativne rezultate, dok ELISA, RAST, RIA i LC-MS/MS omogućuju kvantitativnu analizu (Poms i sur., 2004). Imunoanalitičke metode biraju se prema specifičnosti i osjetljivosti antitijela, te se primjenjuju u prehrambenoj industriji, istraživačkim laboratorijima i državnim institucijama za otkrivanje i kvantifikaciju alergena u hrani (Poms i sur., 2004).

Metode temeljene na proteinima za otkrivanje potencijalnih alergena kikirikija mogu se dodatno podijeliti na testove za detekciju ukupnih proteina i testove usmjerene na specifične alergene (Krska i sur., 2004). Testovi usmjereni na specifične alergene omogućuju preciznu identifikaciju alergena kikirikija, dok testovi za detekciju proteina otkrivaju širok spektar proteina, uključujući i one na niskim razinama. Najčešće korištena metoda u ovoj skupini je ELISA, koja je poznata po visokoj preciznosti, jednostavnosti upotrebe i mogućnosti standardizacije (Poms i sur., 2004).

U većini imunoloških metoda, reakcija antigen-antitijelo predstavlja ključan korak, a odabir odgovarajućeg izvora antitijela je od velike važnosti. Prvotno su se koristila antitijela iz seruma pacijenata senzibiliziranih na alergene (Keating i sur., 1990), no zbog etičkih i praktičnih razloga, danas se koriste poliklonska antitijela iz životinja poput kunića, ovaca ili koza, kao i monoklonska antitijela miševa. Ovisno o vrsti analita, ovi se testovi dijele na one koji detektiraju ukupne proteine i one koji su usmjereni na specifične alergene kikirikija. Testovi za otkrivanje proteina, poput ELISA metode, omogućuju identifikaciju širokog spektra proteina pri nižim koncentracijama, što ih čini posebno korisnima u analitičkim postupcima (Wen i sur., 2007).

2.3.2. Molekularno-genetske metode

Detekcija alergena u hrani korištenjem metoda temeljenih na proteinima može biti izazovna, posebno kada su alergeni prisutni u malim količinama ili su skriveni u složenim prehrambenim matricama. U takvim slučajevima, molekularno-genetske metode su se pokazale kao učinkovita alternativa i dopuna ovim klasičnim pristupima, osobito kada metode temeljene na proteinima ne daju zadovoljavajuće rezultate. Ove metode karakteriziraju visoka preciznost i specifičnost, a često su otpornije na nepovoljne uvjete obrade u usporedbi s proteinskim alergenima (Mustorp i sur., 2008). Ključna tehnologija na kojoj se molekularno-genetske metode temelje je lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), koja omogućava

umnožavanje specifičnih DNA sekvenci.

Ipak, postoje određeni nedostaci ovih metoda, među kojima je rizik od lažno negativnih rezultata ako hrana sadrži djelomično ili potpuno denaturiranu DNA, kao i mogućnost smanjenja učinkovitosti umnožavanja DNA zbog prisutnosti određenih komponenti hrane. U usporedbi s ELISA metodama, molekularno-genetske metode su složenije i zahtijevaju više opreme, što ih čini manje prikladnima za rutinske analize. Osjetljivost DNA-testova uvelike ovisi o količini i kvaliteti DNA u uzorku hrane, koja može biti u niskim koncentracijama ili oštećena tijekom obrade (Holzhauser i sur., 2006). Unatoč tome, ove metode su korisne za regulatorne agencije i institucije koje raspolažu potrebnom opremom.

Trenutno se koriste tri pristupa DNA metodama za otkrivanje alergena u hrani: PCR u kombinaciji s gel-elektroforezom, PCR u kombinaciji s ELISA-om i RT-PCR (engl. *Real-Time PCR*) (Boye i sur., 2012). PCR je jednostavna, brza i specifična metoda koja koristi termostabilne enzime za umnožavanje specifičnih dijelova DNA (Butorac i sur., 2013). Postoje dvije glavne PCR metode za detekciju alergena kikirikija: RT-PCR i DNA ELISA, s granicom detekcije ispod 10 ppm (Hefle, 2006).

Iako DNA može biti potpuno razgrađena u određenim vrstama hrane, što može rezultirati lažno negativnim rezultatima, DNA se obično lakše ekstrahira u nepovoljnim uvjetima i manje je podložna gubicima tijekom ekstrakcije u usporedbi s proteinima. Međutim, PCR metode detektiraju prisutnost DNA, a ne specifičnog alergena, što može dovesti do lažnih rezultata, dok ELISA metoda cilja proteine iz uzorka hrane. Prednost PCR metode je brzina analize kada je poznata sekvenca DNA, dok razvoj ELISA testova može potrajati mjesecima, osobito ako je potrebno pročišćavanje specifičnog proteina i razvoj specifičnih antitijela. Iako se očekuje da metode temeljene na DNA neće u potpunosti zamijeniti proteinske metode, one će i dalje postojati kao važne komplementarne metode (Mustorop i sur., 2007).

2.4. ELISA METODA

2.4.1. Općenito o ELISA metodi

ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metoda omogućava detekciju i kvantifikaciju antigena putem specifičnog vezanja antitijela na antigen iz uzorka, uz praćenje reakcije spektrofotometrijskim mjerenjem koje detektira promjenu boje. Ova metoda je izuzetno osjetljiva, omogućujući određivanje niskih koncentracija analita, ponekad i u rasponu od nekoliko nanograma po kilogramu uzorka (Butorac i sur., 2013). ELISA metoda predstavlja jednu od ključnih tehnika za otkrivanje i kvantificiranje alergena u prehrambenim proizvodima. U literaturi je opisana kvantifikacija raznih alergena koristeći ovu metodu, uključujući alergene poput kravljeg mlijeka, lješnjaka, kikirikija, soje i glutena, s granicom detekcije koja se kreće od 0,1 do 20 mgkg⁻¹ (Prado i sur., 2016). Također, zbog svojih karakteristika, ELISA se široko

primjenjuje i u području sigurnosti hrane, u detekciji alergena kao i u otkrivanju kontaminacija mikroorganizmima, pesticidima i antibioticima (Chen i sur., 2012). ELISA se smatra najčešće korištenom metodom u prehrambenoj industriji i službama za kontrolu kvalitete hrane (Van Hengel, 2007). Komercijalni ELISA testovi često se koriste za detekciju i kvantifikaciju alergena kikirikija, a sve je popularnija i uporaba PCR metoda. ELISA testovi razvijeni su za brojne alergene poput badema, rakova, jaja, lješnjaka, mlijeka, sezama i soje, pri čemu se limiti detekcije i kvantifikacije razlikuju ovisno o analiziranom alergenu i proizvođaču seta za analizu (Koppelman i Hefle, 2006). Na tržištu su dostupni setovi različitih proizvođača, koji koriste razne ELISA testove, uključujući "sandwich" i konkurentnu ELISA metodu. Antitijela korištena u testovima proizvode se imunizacijom životinja poput zeca, miša, koze, konja, ovce i kokoši (Poms i sur., 2005). Korištenje monoklonskih antitijela omogućuje detekciju specifičnih epitopa antigena, dok poliklonska antitijela detektiraju sve prisutne epitope alergena (Goodwin, 2004). Postoje značajne razlike među komercijalnim ELISA testovima u pogledu pripreme uzoraka i pH ekstrakcijskog pufera, što može utjecati na učinkovitost ekstrakcije proteina iz uzorka, a time i na daljnju analizu. Također, testovi se razlikuju u standardima kikirikija korištenim za izradu kalibracijskih krivulja; neki testovi koriste pročišćeni ekstrakt proteina, dok drugi koriste ukupni topljivi ekstrakt proteina kikirikija (Zeleny i Schimmel, 2010). Postoje značajne razlike među komercijalnim ELISA testovima u pogledu pripreme uzoraka i pH ekstrakcijskog pufera, što može utjecati na učinkovitost ekstrakcije proteina iz uzorka, a time i na daljnju analizu. Također, testovi se razlikuju u standardima kikirikija korištenim za izradu kalibracijskih krivulja; neki testovi koriste pročišćeni ekstrakt proteina, dok drugi koriste ukupni topljivi ekstrakt proteina kikirikija (Zeleny i Schimmel, 2010).

Hefle i suradnici (1994) prvi su opisali ELISA metodu za detekciju tragova kikirikija, s granicom detekcije ispod 40 mgkg^{-1} . Sljedeća istraživanja usmjerila su se na smanjenje limita detekcije. Primjerice, Yeung i Collins (1996) opisali su konkurentnu ELISA metodu koja postiže granicu detekcije od $0,4 \text{ mgkg}^{-1}$, bez pojave križnih reakcija s drugim sastojcima poput čokolade, keksa i drugih konditorskih proizvoda. Osjetljivost i limiti detekcije analitičkog sustava za alergene u laboratorijskim uvjetima trebali bi biti dovoljno niski da omoguće otkrivanje alergena u udjelima koji bi mogli izazvati alergijske reakcije kod osjetljivih osoba. Trenutno su dostupni ELISA testovi za detekciju kikirikija s limitom detekcije za Ara h 1 od $0,1 \text{ mgkg}^{-1}$, za Ara h 2 od $0,5 \text{ mgkg}^{-1}$, i za proteine kikirikija $2,5 \text{ mgkg}^{-1}$. Limiti kvantifikacije za Ara h 1 i Ara h 2 kreću se od 1 do 20 mgkg^{-1} , odnosno 1 do 15 mgkg^{-1} , dok se za proteine kikirikija kreću od $3,3$ do 90 mgkg^{-1} (Fielder i sur., 2010).

Pomès i suradnici (2003) istraživali su prisutnost alergena kikirikija Ara h 1 u 83 različita prehrambena proizvoda koristeći ELISA metodu. Udio ovog alergena varirao je od 0,1 do $500 \mu\text{g}$ po gramu proizvoda, potvrđujući da se ELISA može koristiti za praćenje kontaminacije

tijekom proizvodnje, kao i za identifikaciju minimalnih količina alergena koje mogu izazvati reakciju kod osjetljivih osoba.

Zagon i sur. (2015) istraživali su prisutnost proteina kikirikija u 899 uzoraka pakirane hrane koja ne sadrži kikiriki u sklopu francuskog istraživačkog projekta "*Mirabe!*". Prvo je korištena imunokromatografska metoda (engl. *Lateral Flow Assay*) s granicom detekcije od 2 mgkg⁻¹ kikirikija ili 0,5 mgkg⁻¹ proteina kikirikija, pri čemu je pozitivno bilo 139 uzoraka, a rezultati su potvrđeni *Real-time* PCR metodom. Od tih uzoraka, 9 je pokazalo mjerljive tragove kikirikija, s udjelima između 5 i 20 mgkg⁻¹ (Zagon i sur., 2015).

Elegbede i sur. (2015) razvili su metodu za optimizaciju uzorkovanja u sustavu kontrole i monitoringa alergena unutar projekta "*Mirabe!*". Njihovo istraživanje pokazalo je veću vjerojatnost prisutnosti tragova kikirikija u proizvodima bez upozorenja nego u onima s upozorenjem, posebno u kategorijama čokolade i žitarica za doručak. Pretjerano korištenje općih upozorenja o mogućim tragovima alergena od strane proizvođača, bez navođenja stvarnih koncentracija alergena, može biti jedan od razloga za takve rezultate. Istraživanje je predložilo metodologiju optimizacije uzoraka za procjenu rizika skrivenih alergena, kao alat za monitoring tragova alergena od strane nadležnih tijela (Elegbede i sur., 2015).

Prednosti ELISA metode uključuju brzinu i jednostavnost korištenja, standardizirani format, visoku osjetljivost i selektivnost za tragove alergena, dostupnost reagensa te mogućnost brze obrade podataka. Međutim, postoje i nedostaci, kao što su duže vrijeme razvoja, moguća križna reaktivnost, efekt matriksa, lažno pozitivni rezultati, potreba za potvrdom rezultata drugom metodom, nemogućnost simultane analize više alergena i poteškoće u prepoznavanju problema bez osiguranja kvalitete testa (Koppelman i Hefle, 2006; Hefle, 2006).

ELISA metoda temelji se na kombinaciji imunološke i kemijske reakcije. Imunološka komponenta uključuje specifično vezanje antigena na antitijelo, dok kemijska reakcija, koju pokreće enzim, rezultira promjenom boje koja omogućuje kvantitativnu analizu (Engvall i Perlmann, 1971). Zbog svoje visoke osjetljivosti, ELISA je pogodna za detekciju analita u vrlo niskim koncentracijama, što je čini korisnom u procjeni usklađenosti sastava prehrambenih proizvoda s deklaracijama te u skladu sa zakonskim propisima.

Ova metoda također omogućava detekciju proteina, ugljikohidrata i lipida, uz pretpostavku da su dostupna odgovarajuća antitijela (Butorac i sur., 2013). ELISA se koristi za detekciju specifičnih alergena ili smjesa proteina, gdje se antigen-antitijelo kompleks vizualizira pomoću kolorimetrijskog testa, a koncentracija antigena se kvantificira mjerenjem optičke gustoće i primjenom standardne krivulje (Boye i sur., 2012).

Zbog svoje visoke osjetljivosti i specifičnosti, dostupnosti automatizacije i jednostavnosti korištenja, ELISA je postala najčešće korištena metoda za detekciju alergena u prehrambenoj industriji (Taylor i sur., 2009).

2.4.2. Vrste ELISA metoda

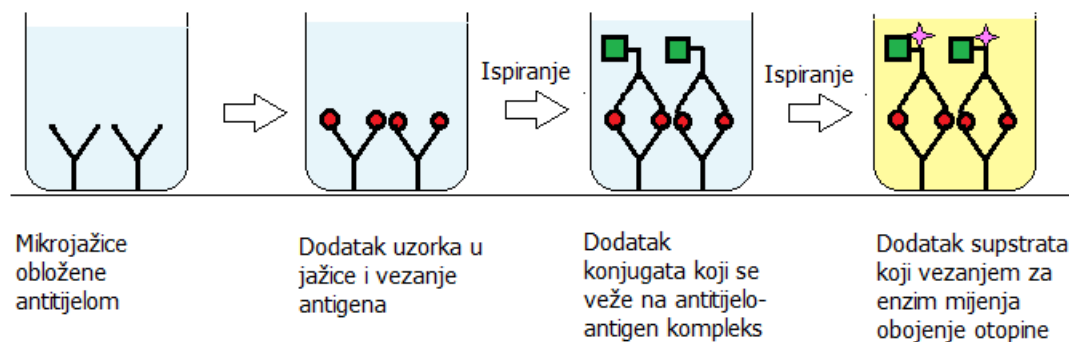
2.4.2.1. Direktna ili "sandwich" ELISA

Metoda "sandwich" ELISA najčešće se koristi za detekciju i kvantifikaciju specifičnih topljivih proteina. Ova tehnika uključuje korištenje visoko pročišćenih antitijela, koja vežu antigene iz uzorka, imobiliziranih na mikrojažicama; kada se uzorak ili standardna otopina doda, antigen se veže na ta antitijela. Nakon što se nevezani antigen ispere, sekundarno antitijelo konjugirano s enzimom se dodaje i veže za antigen, stvarajući "sandwich" strukturu. Zatim se uvodi supstrat koji reagira s enzimom, proizvodeći obojeni produkt, čiji intenzitet obojenja se mjeri spektrofotometrijski. Intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji analita u uzorku (Besler i sur., 2002). Ovaj proces završava dodavanjem STOP otopine koja mijenja boju iz plave u žutu, što se zatim mjeri spektrofotometrijski pomoću mikročitača (Koppelman i Hefle, 2006).

Ova metoda se ističe po tome što je 2-5 puta osjetljivija u odnosu na druge metode (Aydin, 2015).

"Sandwich" ELISA (slika 3) je vrlo osjetljiva metoda koja omogućava detekciju i kvantifikaciju specifičnih proteina zbog toga što antitijela obično imaju dva ili više epitopa za vezanje na antigen. Najjednostavnija varijanta "sandwich" ELISA metode koristi visoko pročišćena specifična antitijela koja su imobilizirana na plastičnim mikrojažicama te kada se na njih doda uzorak ona specifično vežu prisutni antigen, dok se ostatak uzorka ispire. Dodatkom antitijela povezanog s enzimom, koje omogućava detekciju nastalog kompleksa antitijelo-antigen putem promjene boje, dolazi do promjene intenziteta obojenja te se ono mjeri spektrofotometrijski, a izravno je proporcionalno koncentraciji antigena (Tizard, 1996).

Ova metoda je specifičnija od konkurentne ELISA metode jer zahtijeva antitijela usmjerena na dva ili više epitopa. "Sandwich" ELISA koristi visoko pročišćena, specifična antitijela adsorbirana na plastičnoj podlozi, koja specifično vežu antigene prisutne u uzorku, kao što su alergeni hrane. Kod konkurentne metode rezultati se kvantificiraju u odnosu na baždarnu krivulju (Yeung, 2006), a najveća prednost je upravo mogućnost kvantitativnog analiziranja uzoraka koji sadrže niske koncentracije analita (Cellsignal, 2001).



Slika 3. Prikaz "sandwich" ELISA metode (Anonymous, 2015)

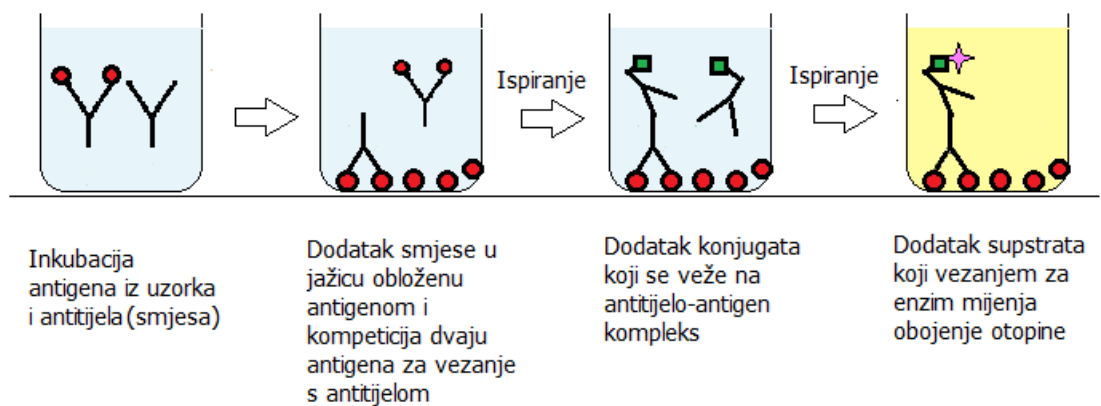
2.4.2.2. Konkurentna ELISA

Konkurentna ELISA metoda (slika 4) obično se izvodi s antigenom imobiliziranim na dno mikrojažica. U svaku jažicu dodaje se smjesa primarnog antitijela i slobodnog antigena iz uzorka, što izaziva kompetitivno vezanje između slobodnog antigena i onog imobiliziranog. Ovaj proces rezultira formiranjem kompleksa antitijelo-antigen. Nakon ispiranja nevezanih tvari, dodaje se sekundarno antitijelo označeno enzimom, koje prepoznaje i veže se za antigen-antitijelo kompleks, a reakcijom sa supstratom dolazi do stvaranja obojenog produkta. Intenzitet obojenja dobivenog obojenog produkta odražava koncentraciju antigena (Yeung, 2006; Besler i sur., 2002).

U situacijama kada u uzorku nema antigena, antitijelo s enzimom veže se isključivo za imobilizirani antigen, što rezultira visokom apsorbancijom obojenog produkta. S druge strane, kada je prisutno više slobodnog antigena, dolazi do inhibicije vezanja enzimom obilježenog antitijela, što rezultira slabijim obojenjem. Tako je koncentracija antigena u uzorku obrnuto proporcionalna intenzitetu boje (Butorac i sur., 2013; Besler i sur., 2002). To znači da veća količina antigena uzrokuje slabije obojenje, što je rezultat veće kompeticije između slobodnog i imobiliziranog antigena za vezanje s antitijelom (Yeung, 2006; Besler i sur., 2002).

Ovaj oblik ELISA metode često koristi mikrojažice obložene specifičnim antigenima. Primarno antitijelo i antigen iz uzorka natječu se za vezanje s imobiliziranim antigenom. Antigen iz uzorka, koji prvi stupa u kontakt s antitijelom, ima prednost u formiranju kompleksa antitijelo-antigen. Ako antitijelo ne uspije vezati antigen iz uzorka, ono se veže za imobilizirani antigen na jažici (Besler i sur., 2002).

Ova metoda je iznimno korisna za detekciju malih proteina i analita u uzorcima, a daljnji razvoj tehnologije omogućio je enzimsko označavanje analita ili specifičnih antitijela, čime se dodatno povećava osjetljivost (Boye i sur., 2012; Poms i sur., 2004).



Slika 4. Prikaz konkurentne ELISA metode (Anonymous, 2015)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci

Za potrebe diplomskog rada prikupljeno je ukupno 40 uzoraka iz 5 skupina prehrambenih proizvoda pri čemu je svaka skupina sadržavala kategorije nepretpakiranih i pretpakiranih uzoraka, a u kojima je pomoću ELISA metode analiziran udio potencijalnih alergena kikirikija. Svi uzorci su nabavljeni na području grada Zagreba; nepretpakirani iz slastičarnica i objekata javne prehrane kao što su restorani, a pretpakirani iz trgovačkih lanaca. Analizirano je 8 uzoraka sladoleda pri čemu 4 iz slastičarnica (SS1, SS2, SS3 i SS4) i 4 iz trgovačkih lanaca (ST1, ST2, ST3 i ST4), 8 uzoraka žitarica za doručak pri čemu 4 iz slastičarnica (ŽS1, ŽS2, ŽS3 i ŽS4) i 4 iz trgovačkih lanaca (ŽT1, ŽT2, ŽT3 i ŽT4), 8 uzoraka kolača pri čemu 4 iz slastičarnica (KS1, KS2, KS3 i KS4) i 4 iz trgovačkih lanaca (KT1, KT2, KT3 i KT4), 8 uzoraka keksa i čajnih peciva pri čemu 4 iz slastičarnica (ČKS1, ČKS2, ČKS3 i ČKS4) i 4 iz trgovačkih lanaca (ČKT1, ČKT2, ČKT3 i ČKT4), te 8 uzoraka gotovih jela pri čemu 4 iz objekata javne prehrane kao što su restorani (GR1, GR2, GR3 i GR4) i 4 iz trgovačkih lanaca (GT1, GT2, GT3 i GT4). Obzirom na sastav, uzorci sladoleda, žitarica za doručak, kolača, keksa i čajnih peciva bili su na bazi orašastih plodova, čokolade, kakaovih dijelova i vanilije te na popisu sastojaka nisu sadržavali kikiriki, dok su uzorci gotovih jela bili na bazi slanutka (ukupno 4) i ječma (ukupno 4) te također nisu sadržavali kikiriki na popisu sastojaka.

3.1.2. Jelovnici dostupni na mrežnim stranicama objekata javne prehrane

Analizirano je 25 jelovnika dostupnih na mrežnim stranicama objekata javne prehrane u svrhu analize pružanja informacija potrošačima o alergenima kikirikija u nepretpakiranoj hrani.

3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor

Tijekom istraživanja i laboratorijskih ispitivanja upotrijebljeni su sljedeći uređaji:

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



Slika 5. ELISA-čitač



Slika 6. Centrifuga

Korišten je slijedeći pribor i laboratorijsko posuđe:

- automatska jednokanalna pipeta
- boca štrcaljka
- Eppendorf plastične posudice
- tikvice
- filter-papir
- laboratorijska čaša od 100 mL
- laboratorijska čaša od 250 mL
- metalni stalak za epruvete
- nastavak za pipetu
- nosač za mikrojažice, AgraQuant, Romer Labs, Austrija
- odmjerna tikvica od 10 mL
- odmjerna tikvica od 200 mL
- pipeta od 1 mL
- pipeta od 10 mL
- stakleni lijevak
- stakleni štapić
- staničevina
- spatula
- plastična žličica.

3.1.4. Kemikalije i reagensi

- AgraQuant, Peanut, Extraction & Sample Dilution Buffer, Romer Labs, Austrija (ekstrakcijski pufer)
- AgraQuant, Peanut, Wash Buffer, Romer Labs, Austrija (pufer za ispiranje)
- AgraQuant-Peanut Enzyme, Romer Labs, Austrija (reagens sa zelenim poklopcem, konjugat) (slika 7)
- AgraQuant-Substrate, Romer Labs, Austrija (reagens s plavim poklopcem) (slika 7)
- AgraQuant-Stop Solution, Romer Labs, Austrija (reagens s crvenim poklopcem) (slika 7)
- Filtrat pročišćenog uzorka.



Slika 7. Reagensi iz seta za ELISA metodu

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema reakcijskih otopina

Otopine ekstrakcijskog pufera i pufera za ispiranje pripremljene su svakodnevno u potrebnoj količini za rad. Koncentrat ekstrakcijskog pufera iz seta za ELISA metodu razrijeđen je destiliranom vodom u omjeru 1:10, tako što je 20 mL koncentrata otpipetirano u tikvicu od 200 mL i dopunjeno destiliranom vodom do oznake. Koncentrat pufera za ispiranje razrijeđen je na isti način, pipetiranjem 1 mL koncentrata u tikvicu od 10 mL i dopunjavanjem destiliranom vodom do oznake. Pripremljene otopine čuvane su pri 4 °C do upotrebe. Neposredno prije upotrebe, otopine su izvađene iz hladnjaka kako bi dosegle sobnu temperaturu.

3.2.2. Priprema uzoraka za analizu

Uzorak je prvo mehanički homogeniziran, a zatim je na analitičkoj vagi izvagano 1,0000 g homogeniziranog uzorka u plastičnu epruvetu. U uzorak je dodano 20 mL razrijeđenog ekstrakcijskog pufera, nakon čega je sve zajedno vorteksirano dok uzorak nije u potpunosti otopljen. Dobivena suspenzija inkubirana je petnaest minuta u prethodno zagrijanoj vodenoj kupelji pri 60 °C, uz snažno protresanje svake dvije minute. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana 10 minuta pri 2000 okretajamin⁻¹ kako bi se dobio bistri supernatant. Zbog prisutnosti čestica, supernatant je profiltriran kroz filter papir. Dobiveni filtrat predstavljao je pročišćeni uzorak spreman za određivanje potencijalnih alergena kikirikija ELISA metodom.

3.2.3. ELISA metoda

3.2.3.1. Princip određivanja

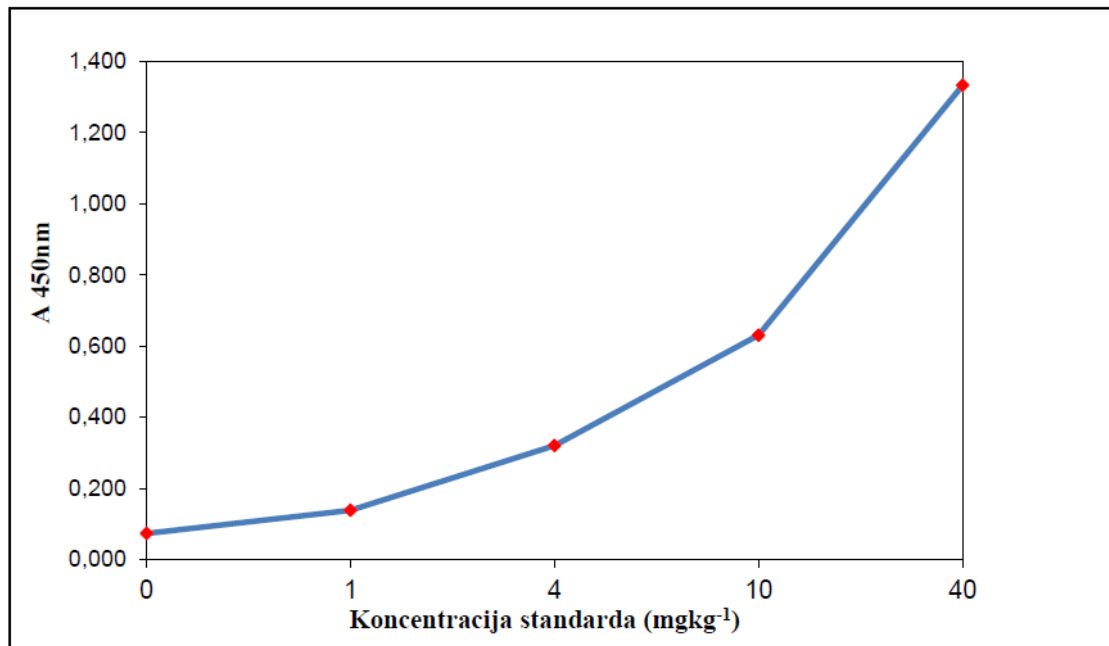
AgraQuant test za kikiriki, korišten u ovoj metodi, spada u "sandwich" ELISA metodu prema tehnici određivanja. Proteini kikirikija se ekstrahiraju iz uzorka pomoću ekstrakcijskog pufera, dok su primarna antitijela nanosena na mikrojažice u tankom sloju. Kada se ekstrahirani uzorci (ili standardi za kalibracijsku krivulju) dodaju u mikrojažice, proteini kikirikija se vežu za antitijela. Nakon ispiranja, u mikrojažice se dodaje sekundarno antitijelo obilježeno enzimom i inkubira određeno vrijeme. Slijedi ponovno ispiranje i dodavanje supstrata za enzim, pri čemu dolazi do razvoja plave boje. Intenzitet ove boje je proporcionalan koncentraciji proteina kikirikija u uzorku (ili standardu). Nakon određenog vremena dodaje se "stop" otopina, koja plavu boju mijenja u žutu. Intenzitet žute boje se mjeri spektrofotometrijski pri 450 nm, a koncentracija potencijalnih alergena kikirikija (mgkg^{-1}) određuje se na osnovu kalibracijske krivulje.

3.2.3.2. Postupak određivanja

Set od osam mikrojažica obloženih antitijelima stavljen je na držač, dok su preostale mikrojažice vraćene u vrećicu s desikantom za buduća mjerenja. Jednokanalnom pipetom dodano je 100 μL filtriranog uzorka u svaku jažicu, pri čemu je za svaki uzorak korišten novi nastavak za pipetu kako bi se izbjegla kontaminacija. Držač s mikrojažicama inkubiran je pri sobnoj temperaturi 20 minuta, nakon čega je sadržaj jažica uklonjen u otpadni spremnik. Svaka jažica je isprana pet puta sa 100 μL razrijeđenog pufera za ispiranje, a zatim je višak tekućine uklonjen lupkanjem o staničevinu kako bi se jažice osušile.

Nakon sušenja, u svaku jažicu je dodano 100 μL konjugata iz bočice sa zelenim poklopcem i inkubirano pri sobnoj temperaturi 20 minuta bez pomicanja držača kako bi se spriječila unakrsna kontaminacija. Ponovno je sadržaj jažica uklonjen, jažice su isprane pet puta sa 100 μL razrijeđenog pufera za ispiranje i osušene lupkanjem o staničevinu. Zatim je dodano 100 μL supstrata iz bočice s plavim poklopcem u svaku jažicu, koja je inkubirana 20 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije, u svaku jažicu je dodano 100 μL "stop" otopine iz bočice s crvenim poklopcem, što je promijenilo boju iz plave u žutu.

Držač s mikrojažicama je pažljivo prenesen do čitača s filterom od 450 nm (slika 5), pomoću kojeg su očitane vrijednosti apsorbancije. Na temelju prethodno izrađenog baždarnog dijagrama standarda kikirikija (slika 8), određen je udio alergena kikirikija u svakom od ispitivanih uzoraka, pri čemu su koncentracije otopina standarda iznosile 0, 1, 4, 10 i 40 mgkg^{-1} .



Slika 8. Baždarni dijagram standarda kikirikija

3.2.4. Analiza jelovnika dostupnih na mrežnim stranicama objekata javne prehrane

U svrhu analize pružanja informacija potrošačima o alergenima kikirikija u nepretpakiranoj hrani, tijekom ovog istraživanja dodatno su analizirane dostupne mrežne stranice objekata javne prehrane. Ukupno je analizirano 25 jelovnika dostupnih na mrežnim stranicama, a obzirom na sadržaj informacija potrošačima o alergenima kikirikija u nepretpakiranoj hrani, odnosno ponuđenim jelima.

3.2.5. Obrada podataka

Dobiveni rezultati su analizirani pomoću Microsoft Excel programa metodama deskriptivne statistike.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom ovoga istraživanja imunoenzimskom ELISA metodom, određen je udio potencijalnih alergena kikirikija u u 8 uzoraka sladoleda, 8 uzoraka žitarica za doručak, 8 uzoraka kolača, 8 uzoraka keksa i čajnih peciva, te 8 uzoraka gotovih jela prikupljenih u obliku nepretpakiranih uzoraka u slastičarnicama i objektima javne prehrane kao što su restorani te u oblku pretpakiranih uzoraka u trgovačkim lancima. Dobiveni rezultati određivanja udjela potencijalnih alergena kikirikija (mgkg^{-1}) prikazani su u tablicama te uspoređeni sa navodima o prisutnosti alergena kikirikija u okviru informacija o hrani analiziranih proizvoda.

4.1. UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA SLADOLEDA, ŽITARICA ZA DORUČAK I SLASTICA

U ovom istraživanju je primjenom ELISA metode kvantitativno određen udio alergena kikirikija u uzorcima sladoleda, žitarica za doručak, kolača, keksa i čajnih peciva, te gotovih jela. Uzorci sladoleda, žitarica za doručak, kolača, keksa i čajnih peciva su sadržavali orašaste plodove, čokoladu, kakaove dijelove i vaniliju, dok su uzorci gotovih jela sadržavali slanutak ili ječam. Korišteni set za ELISA metodu, AgraQuant Peanut Assay, nabavljen je od proizvođača Romer Labs, Austrija, uz limit detekcije od $0,10 \text{ mgkg}^{-1}$. Udio alergena kikirikija u 40 analiziranih uzoraka izražen je u mgkg^{-1} , a rezultati su prikazani u tablicama 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13 i 14 te na slici 8. Uz rezultate ELISA metode, u tablicama 3, 6, 9, 12 i 15 su prikazani podaci navedeni u okviru informacija o hrani analiziranih proizvoda, a koji se odnose na moguću prisutnost alergena kikirikija.

Rezultati određivanja alergena kikirikija u nepretpakiranim uzorcima sladoleda iz slastičarnica prikazani su u tablici 1, dok su u tablici 2 prikazani rezultati određivanja alergena kikirikija u pretpakiranim uzorcima sladoleda iz trgovačkih lanaca.

Tablica 1. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n= 4$) sladoleda iz slastičarnica

UZORAK	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg^{-1}] srednja vrijednost \pm SD
SS1	$1,96 \pm 0,001$
SS2	$0,18 \pm 0,000$
SS3	$0,58 \pm 0,001$
SS4	$2,35 \pm 0,000$
PROSJEČNA VRIJEDNOST	1,27
RASPON	0,18 - 2,54

Tablica 2. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n= 4$) sladoleda iz trgovačkih lanaca

UZORAK	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg^{-1}] srednja vrijednost \pm SD
ST1	$0,52 \pm 0,008$
ST2	$0,75 \pm 0,014$
ST3	$0,37 \pm 0,018$
ST4	$0,86 \pm 0,000$
PROSJEČNA VRIJEDNOST	0,63
RASPON	0,37 - 0,86

Prisutnost alergena kikirikija detektirana je u svim uzorcima. Dobivene analitičke vrijednosti za

uzorke iz slastičarnica kreću se u rasponu od 0,18 do 2,54 mgkg⁻¹, dok je prosječna vrijednost 1,27 mgkg⁻¹. Vrijednosti za uzorke iz trgovačkih lanaca kreću se u rasponu od 0,37 do 0,86 mgkg⁻¹, a srednja vrijednost iznosi 0,63 mgkg⁻¹.

Prisutnost alergena kikirikija u prehrambenim proizvodima, uključujući sladolede, postavlja značajan izazov za subjekte u poslovanju hranom (SPH). Europska Uredba (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani strogo zahtijeva jasno označavanje alergena na svim prehrambenim proizvodima, što uključuje i slastičarnice i trgovačke lance. Prema Uredbi br. 1169/2011, svi alergeni moraju biti jasno označeni na prehrambenim proizvodima. To se odnosi na proizvode u trgovačkim lancima, kao i na svježe proizvedene sladolede u slastičarnicama. Prisutnost kikirikija, bilo kao sastojka ili zbog kontaminacije, mora biti jasno navedena na deklaraciji proizvoda ili u meniju.

U Republici Hrvatskoj, zakonski okvir reguliranja alergena u hrani temelji se na Zakonu o hrani (Zakon, 2018) i Zakonu o informiranju potrošača o hrani (Zakon, 2013), koji su usklađeni s europskim standardima. Ovi propisi obvezuju SPH da jasno deklariraju prisutnost alergena, uključujući kikiriki, na deklaracijama proizvoda. Svi sladoledi, bez obzira na to jesu li pakirani ili se prodaju u slastičarnicama, moraju biti označeni prema propisima kako bi se potrošačima pružile sve potrebne informacije.

Informacije vezane uz uzorke iz slastičarnica (SS1 do SS4) o mogućoj prisutnosti alergena u uzorcima dobivene su usmenim putem te je napomenuto kako ne postoji mogućnost prisutnosti alergena kikirikija u odabranim uzorcima. S obzirom na dobivene rezultate ELISA metode, koji pokazuju prisutnost alergena kikirikija u svim uzorcima, potrebno je obratiti pažnju na pružanje informacija kupcima, ali i na edukaciju zaposlenika o proizvodima te njihovom sastavu.

Za uzorke nabavljene iz trgovačkih lanaca (ST1 do ST4) informacije vezane za mogućnost prisutnosti alergena u uzorcima nalaze se u okviru informacija o hrani na pakiranju analiziranih uzoraka. Uspoređujući dobivene analitičke rezultate sa navodima (tablica 3) o prisutnosti alergena kikirikija na ambalaži vidljivo je kako uzorci ST2, ST3 i ST4 sadrže navod koji je vezan uz prisutnost alergena kikirikija, dok uzorak ST1 sadrži navod vezan uz prisutnost orašastog voća. Dobiveni rezultati se stoga podudaraju sa navodima na deklaraciji proizvoda.

Tablica 3. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka sladoleda iz trgovačkih lanaca vezani uz prisutnost alergena kikirikija

UZORAK	NAVOD NA DEKLARACIJI
ST1	“Može sadržavati orašasto voće u tragovima.”
ST2	“Može sadržavati u tragovima jaja, kikiriki i orašasto voće.”
ST3	“Može sadržavati pšenicu, jaja, kikiriki i ostalo orašasto voće. ”
ST4	“Može sadržavati GLUTEN, KIKIRIKI, ORAŠASTO VOĆE, JAJA.”

Rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima žitarica za doručak prikazani su u tablici 4 za nepretpakirane uzorke iz slastičarnica te tablici 5 za pretpakirane uzorke iz trgovačkih lanaca. Dobivene analitičke vrijednosti za uzorke iz slastičarnica kreću se u rasponu od 0,51 do 2,54 mgkg⁻¹, dok im je srednja vrijednost 1,46 mgkg⁻¹. Za uzorke iz trgovačkih lanaca raspon dobivenih analitičkih vrijednosti se kreće od 0,5 do 1,26 mgkg⁻¹ dok srednja vrijednost iznosi 0,88 mgkg⁻¹. Prisutnost alergena kikirikija detektirana je u svim uzorcima izuzev uzorka ŽS1 u kojem nije utvrđena prisutnost alergena kikirikija, odnosno dobivena koncentracija prilikom analize je ispod limita detekcije (LOD), koji za ELISA metodu korištenu u ovom istraživanju iznosi 0,10 mgkg⁻¹.

Tablica 4. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n= 4$) žitarica za doručak iz slastičarnica

UZORAK	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg^{-1}] srednja vrijednost \pm SD
ŽS1	<LOD
ŽS2	$0,5 \pm 0,002$
ŽS3	$0,87 \pm 0,001$
ŽS4	$1,26 \pm 0,001$
PROSJEČNA VRIJEDNOST	1,46
RASPON	0,51 - 2,54

*LOD – limit detekcije

Tablica 5. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n= 4$) žitarica za doručak iz trgovačkih lanaca

UZORAK	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg^{-1}] srednja vrijednost \pm SD
ŽT1	$1,22 \pm 0,001$
ŽT2	$2,54 \pm 0,001$
ŽT3	$0,51 \pm 0,000$
ŽT4	$1,56 \pm 0,000$
PROSJEČNA VRIJEDNOST	0,88
RASPON	0,5 - 1,26

Informacije o mogućoj prisutnosti alergena kikirikija u uzorcima žitarica za doručak iz slastičarnica su dobivene usmenim putem te je napomenuto kako ne postoji mogućnost prisutnosti alergena kikirikija u uzorcima ŽS2 i ŽS4, dok je za uzorak ŽS1 navedena mogućnost prisutnosti alergena kikirikija, a za uzorak ŽS3 navedeno je kako postoji mogućnost prisutnosti tragova orašastog voća. S obzirom na dobivene rezultate, ELISA test pokazuje prisutnost alergena kikirikija u svim uzorcima izuzev uzorka ŽS1, za koji je navedeno da postoji mogućnost prisutnosti alergena. Također, za uzorak ŽS3 je navedeno kako postoji mogućnost prisutnosti tragova orašastog voća te je detektiran udio alergena kikirikija $0,87 \text{ mgkg}^{-1}$. Uzorci ŽS2 i ŽS4 pokazuju kako je potrebno obratiti pažnju na pružanje informacija kupcima, ali i na edukaciju zaposlenika o proizvodima te njihovom sastavu.

Informacije o prisutnosti alergena kikirikija u uzorcima koji su nabavljeni iz trgovačkih lanaca (ŽT1 do ŽT4) dostupne su unutar deklaracije na pakiranjima analiziranih uzoraka.

Zakonskim propisima na razini Republike Hrvatske te Europske unije propisano je kako pretpakirana hrana, odnosno u ovom slučaju žitarice za doručak koje su bez prisutnosti kupca stavljene u ambalažu, mora imati jasno istaknute alergene u popisu sastojaka. Za nepretpakirane proizvode u trgovinama i objektima javne prehrane, odnosno u ovom slučaju žitarice za doručak koje se stavljaju na tržište bez ambalaže, pakiraju na prodajnom mjestu na zahtjev potrošača, ili su pakirane za izravnu prodaju ili neposrednu konzumaciju, zakonom je propisano kako informacije o alergenima moraju biti dostupne pisanim ili usmenim putem. Vrijednosti dobivene analizom su u skladu sa navodima na deklaraciji (tablica 6), odnosno na svim uzorcima, koji su sadržavali alergene kikirikija, navedena je mogućnost prisutnosti tragova kikirikija i orašastog voća, odnosno orašastih plodova.

Tablica 6. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka žitarica za doručak iz trgovačkih lanaca vezani uz prisutnost alergena kikirikija

UZORAK	NAVOD NA DEKLARACIJI
ŽT1	“Može sadržavati KIKIRIKI i ORAŠASTO VOĆE.”
ŽT2	“Mogući tragovi SOJE, SEZAMA, KIKIRIKIJA i ostalih ORAŠASTIH plodova, MLIJEKA.”
ŽT3	“Može sadržavati KIKIRIKI I ORAŠASTO VOĆE.”
ŽT4	“Proizvod može sadržavati MLIJEKO, KIKIRIKI i ORAŠASTE plodove.”

Rezultati određivanja potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima nepretpakiranih kolača iz slastičarnica prikazani su u tablici 7, odnosno u tablici 8 za pretpakirane uzorke iz trgovačkih lanaca. Dobivene analitičke vrijednosti za uzorke iz slastičarnica kreću se u rasponu od 0,72 do 5,01 mgkg⁻¹, dok je srednja vrijednost 1,92 mgkg⁻¹. Za uzorke kolača iz trgovačkih lanaca dobivene analitičke vrijednosti kreću se u rasponu od 0,44 do 2,93 mgkg⁻¹, a srednja vrijednost iznosi 1,96 mgkg⁻¹.

Tablica 7. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n= 4$) kolača iz slastičarnica

UZORAK	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg^{-1}] srednja vrijednost \pm SD
KS1	5,01 \pm 0,000
KS2	1,02 \pm 0,001
KS3	0,94 \pm 0,000
KS4	0,72 \pm 0,001
PROSJEČNA VRIJEDNOST	1,92
RASPON	0,72 - 5,01

Tablica 8. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n= 4$) kolača iz trgovačkih lanaca

UZORAK	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg^{-1}] srednja vrijednost \pm SD
KT1	2,93 \pm 0,000
KT2	0,44 \pm 0,001
KT3	1,83 \pm 0,001
KT4	2,62 \pm 0,001
PROSJEČNA VRIJEDNOST	1,96
RASPON	0,44 - 2,93

Prisutnost alergena kikirikija detektirana je u svim uzorcima, a najveći udio je određen u uzorku KS1. Informacije o potencijalnim alergenima u uzorcima koji su nabavljeni iz slastičarnica su dobivene usmenim putem te je napomenuto kako u uzorcima ne postoji mogućnost prisutnosti tragova kikirikija. Za uzorke koji su nabavljeni u trgovačkim lancima informacije o mogućnosti prisutnosti tragova kikirikija nalaze se na pakiranju uzorka kao dio informacija o hrani (tablica 9).

Za pretpakirane kolače u trgovačkim lancima, alergeni moraju biti jasno navedeni i istaknuti u popisu sastojaka, a kod ispitivanih uzoraka mogućnost prisutnosti alergena kikirikija pravilno je naznačena u 3 od 4 uzorka. Uzorci KT1, KT2 i KT4 na deklaraciji imaju navedeno kako mogu sadržavati tragove kikirikija i orašastog voća, što je u skladu sa dobivenim rezultatima, dok uzorak KT3 nema navod vezan uz prisutnost kikirikija, ali deklarirano je kako može sadržavati tragove orašastog voća. Za nepretpakirane kolače, odnosno one koji se najčešće u takvom obliku prodaju u slastičarnicama i ostalim objektima javne prehrane, ali i u nekim trgovinama, informacije o alergenima moraju biti dostupne pisanim ili usmenim putem. Objekti javne prehrane moraju osigurati da osoblje može pružiti točne informacije o alergenima. S obzirom na dobivene rezultate određena je prisutnost alergena kikirikija iako je usmenim putem navedeno suprotno, što ukazuje na potrebu za dodatnom edukacijom zaposlenika, ali i eventualnim drugačijim i novim pristupom označavanja samog alergena kikirikija te načinom

upozoravanja kupaca.

U istraživanju u kojem je analizirano pet uzoraka kolača, udio alergena kikirikija kretao se između $0,12 \text{ mgkg}^{-1}$ i $1,15 \text{ mgkg}^{-1}$. Iako su te koncentracije niske, istraživanja pokazuju da čak i vrlo male količine proteina kikirikija (0,1 - 1000 mg) mogu izazvati alergijske reakcije kod predisponiranih pojedinaca (Koppelman i sur., 2004).

Tablica 9. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka kolača iz trgovačkih lanaca vezani uz prisutnost alergena kikirikija

UZORAK	NAVOD NA DEKLARACIJI
KT1	“Može sadržavati tragove soje, orašastog voća, kikirikija, SO ₂ i sezama.”
KT2	“Može sadržavati tragove <u>kikirikija, soje, sezama i orašastog voća.</u> ”
KT3	“Može sadržavati <u>orašasto voće</u> u tragovima.”
KT4	“Može sadržavati u tragovima <u>kikiriki, sezam i orašasto voće.</u> ”

Rezultati određivanja udjela alergena kikirikija u nepretpakiranim uzorcima keksa i čajnih peciva iz slastičarnica prikazani su u tablici 10. Udio potencijalnih alergena kikirikija u uzorcima nabavljenim u slastičarnicama kreće se u rasponu od $0,12 \text{ mgkg}^{-1}$ do $10,51 \text{ mgkg}^{-1}$ te srednja vrijednost za te uzorke iznosi $3,41 \text{ mgkg}^{-1}$. Rezultati određivanja udjela alergena kikirikija u pretpakiranim uzorcima keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca prikazani su u tablici 11 te se dobivene analitičke vrijednosti za ove uzorke kreću u rasponu od 0,4 do $3,69 \text{ mgkg}^{-1}$, a srednja vrijednost iznosi $1,50 \text{ mgkg}^{-1}$.

Tablica 10. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n= 4$) keksa i čajnih peciva iz slastičarnica

UZORCI	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg^{-1}] srednja vrijednost \pm SD
ČKS1	1,22 \pm 0,001
ČKS2	1,77 \pm 0,001
ČKS3	0,12 \pm 0,001
ČKS4	10,51 \pm 0,001
PROSJEČNA VRIJEDNOST	3,41
RASPON	0,12 - 10,51

Tablica 11. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n= 8$) keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca

UZORCI	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg^{-1}] srednja vrijednost \pm SD
ČKT1	0,4 \pm 0,000
ČKT2	3,69 \pm 0,001
ČKT3	0,79 \pm 0,002
ČKT4	1,13 \pm 0,001
PROSJEČNA VRIJEDNOST	1,50
RASPON	0,4 - 3,69

Prisutnost kikirikija detektirana je u svim uzorcima. Za uzorke nabavljene u slastičarnicama je informacija o mogućnosti prisutnosti tragova kikirikija dobivena usmenim putem te je navedeno kako oni ne sadržavaju kikiriki, što se ne podudara sa vrijednostima dobivenim ELISA metodom. Također, najveća određena koncentracija alergena kikirikija je $10,51 \text{ mgkg}^{-1}$ u uzorku ČKS4, koji je nabavljen u slastičarnici u kojoj kikiriki nije naveden kao dio sastojaka te je usmeno od strane djelatnika navedeno kako ga uzorak ne sadrži. Za uzorke koji su nabavljeni u trgovačkim lancima informacija o mogućoj prisutnosti kikirikija u uzorcima je navedena na pakiranju uzorka u dijelu informacija o hrani na deklaraciji te su ti navodi prikazani u tablici 12. Budući da navodi za sve uzorke iz trgovačkih lanaca spominju kako uzorci mogu sadržavati kikiriki ili tragove kikirikija, dobiveni rezultati su sukladni s navodima na pakiranju.

Prisutnost kikirikija u prehrambenim proizvodima, uključujući kekse i čajna peciva, predstavlja izazov za poslovanje s hranom. Na razini EU, svi alergeni moraju biti jasno označeni na prehrambenim proizvodima, uključujući pekarnice i trgovine. Kikiriki, bilo kao sastojak ili zbog kontaminacije, mora biti naveden na deklaraciji proizvoda. Nacionalni propisi zahtijevaju da sva čajna peciva budu pravilno označena kako bi se potrošači informirali o prisutnosti alergena.

Tablica 12. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka keksa i čajnih peciva iz trgovačkih lanaca vezani uz prisutnost alergena kikirikija

UZORAK	NAVOD NA DEKLARACIJI
ČKT1	“Može sadržavati jaja, soju, lješnjak, bademe, sezam i kikiriki. ”
ČKT2	“ Proizvod može sadržavati tragove kikirikija. ”
ČKT3	“ Može sadržavati kikiriki, lješnjake i soju. ”
ČKT4	“Može sadržavati kikiriki, orašasto voće/orašaste plodove i sumporni dioksid. ”

U istraživanju provedenom u Nebraski, analizirano je 200 različitih pakiranih proizvoda kako bi se utvrdila prisutnost kikirikija. Uzorci su obuhvaćali 179 proizvoda s upozorenjima o alergenima te 21 proizvod s jasno navedenim kikirikijem u popisu sastojaka. Proizvodi su pripadali raznim kategorijama kao što su energetske pločice, žitarice, slatkiši, grickalice, smrznuti deserti, brza hrana, sastojci za pečenje i pekarski proizvodi. Ispitane su dvije serije svakog proizvoda, što je ukupno činilo 400 uzoraka. Kikiriki je detektiran u najmanje jednoj seriji kod 10 % (20 od 200)

svih testiranih proizvoda. Od 179 proizvoda s upozorenjima o alergenima, 13 proizvoda bilo je pozitivno na kikiriki u jednoj ili obje serije, uključujući 2 od 51 proizvoda s oznakom "može sadržavati", 3 od 57 proizvoda s oznakom "zajednička oprema", 7 od 68 proizvoda s oznakom "zajedničko postrojenje" te 1 od 3 proizvoda s posebnim upozorenjem o alergenima. Tragovi kikirikija detektirani su u energetskim pločicama (4 od 28 uzoraka), slatkišima (7 od 36) i žitaricama (2 od 26). Nasuprot tome, tragovi kikirikija nisu detektirani ni u jednom proizvodu s upozorenjima o alergenima iz kategorija grickalice (0 od 25), sastojaka za pečenje (0 od 15), pekarskih proizvoda (0 od 32), smrznutih deserata (0 od 9) te brze hrane (0 od 8). Od 21 proizvoda s kikirikijem navedenim u popisu sastojaka, 7 proizvoda sadržavalo je kikiriki. Tragovi kikirikija detektirani su u energetskim pločicama (2 od 2 uzorka), grickalicama (1 od 4), slatkišima (1 od 1) i žitaricama (3 od 11) (Hefle i sur., 2007).

Remington i sur. (2013) proveli su istraživanje u Nebraski, SAD, kako bi utvrdili razine ostataka kikirikija u raznim pakiranjima prehrambenih proizvoda sa savjetodavnim označavanjem, uspoređujući podatke iz 2005. i 2009. godine. Cilj je bio procijeniti potencijalni rizik za potrošače s alergijom na kikiriki, a istraživanje je provedeno u svrhu ponavljanja istraživanja koje su 2007. proveli Hefle i suradnici. Analizirana su ukupno 202 pretpakirana proizvoda, od kojih je 186 imalo savjetodavne oznake vezane za kikiriki, dok je 16 proizvoda imalo kikiriki naveden kao sporedni sastojak. Proizvodi su razvrstani u kategorije kao što su pekarski proizvodi, sastojci za pečenje, slatkiši, žitarice, smrznuti deserti, instant hrana, nutritivne pločice i grickalice. Od svakog proizvoda analizirane su dvije serije, ukupno 404 uzorka. Kikiriki je detektiran u nutritivnim pločicama (6/24), slatkišima (4/32), sastojcima za pečenje (2/16), žitaricama (2/20), grickalicama (1/25) i pekarskim proizvodima (1/43). Nisu pronađene mjerljive razine kikirikija u zamrznutim desertima (0/9) i instant hrani (0/17). Rezultati su bili slični istraživanju Hefle i suradnika iz 2007. godine, koje je pokazalo prisutnost kikirikija u 7,3 % proizvoda sa savjetodavnim oznakama. Istraživanje je također analiziralo 399 različitih nutritivnih pločica iz 2005. i 2009. godine. Od njih, 169 je sadržavalo kikiriki kao sastojak, 166 je imalo savjetodavne oznake o mogućoj prisutnosti kikirikija, 15 je imalo oznake koje upućuju na neprisutnost kikirikija, dok 49 nije imalo nikakve oznake. Od nutritivnih pločica sa sporednim sadržajem kikirikija, 34 od 44 je bilo pozitivno na kikiriki, s razinama do 44,000 mgkg⁻¹. Pet pločica imalo je oznake o proizvodnji u objektima koji koriste kikiriki, s razinama od 17 do 49,000 mgkg⁻¹. Od 159 pločica sa savjetodavnim oznakama, 12 je sadržavalo kikiriki, s razinama od 3 do 26,000 mgkg⁻¹. Dvije od 49 pločica bez oznaka bile su pozitivne na kikiriki, s razinama od 13 i 1,260 mgkg⁻¹. U slučaju 15 proizvoda s oznakama koje upućuju na neprisutnost kikirikija nije zabilježena prisutnost kikirikija. Probabilistička procjena rizika pokazala je značajan rizik od alergijske reakcije kod potrošača alergičnih na kikiriki, ovisno o robnoj marki. Savjetodavno

označavanje može biti prekomjerno korišteno kod nekih pločica, dok je kod drugih primijenjeno s većim oprezom. Probabilistički pristup mogao bi pomoći prehrambenoj industriji u određivanju kada je savjetodavno označavanje najprikladnije.

4.2. UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA U UZORCIMA GOTOVIH JELA

Analizirana su 4 uzorka gotovih jela koja su sadržavala slanutak, te 4 uzorka gotovih jela koja su sadržavala ječam, a uzorci su nabavljeni u restoranima i trgovačkim lancima i to iz svakog objekta po dva uzorka sa slanutkom i po dva uzorka s ječmom. Tablica 13 prikazuje rezultate određivanja udjela alergena kikirikija u nepretpakiranim uzorcima iz objekata javne prehrane kao što su restorani, dok tablica 14 sadrži rezultate za pretpakirane uzorke iz trgovačkih lanaca. Udio alergena kikirikija za uzorke nabavljene u restoranima kreće se u rasponu od 1,21 do 4,65 mgkg⁻¹, dok se raspon udjela alergena kikirikija za uzorke nabavljene u trgovačkim lancima kreće od 0,38 do 0,78 mgkg⁻¹. Srednja vrijednost za uzorke nabavljene iz restorana iznosi 2,43 mgkg⁻¹, dok srednja vrijednost za uzorke nabavljene u trgovačkim lancima iznosi 0,63 mgkg⁻¹. Najviša koncentracija alergena kikirikija određena je u uzorku GR1, 4,65 mgkg⁻¹, dok je u uzorku GT3 određena koncentracija alergena prilikom analize ispod limita detekcije.

Tablica 13. Udio (mgkg⁻¹) alergena kikirikija u uzorcima (n= 4) gotovih jela iz restorana

UZORAK	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg ⁻¹] srednja vrijednost ± SD
GR1	4,65 ± 0,001
GR2	1,28 ± 0,001
GR3	2,57 ± 0,003
GR4	1,21 ± 0,001
PROSJEČNA VRIJEDNOST	2,43
RASPON	1,21 - 4,65

Tablica 14. Udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u uzorcima ($n= 4$) gotovih jela iz trgovačkih lanaca

UZORAK	UDIO ALERGENA KIKIRIKIJA [mgkg^{-1}] srednja vrijednost \pm SD
GT1	$0,74 \pm 0,001$
GT2	$0,38 \pm 0,001$
GT3	<LOD*
GT4	$0,75 \pm 0,001$
PROSJEČNA VRIJEDNOST	0,63
RASPON	0,38 - 0,78

Kod nabave uzoraka iz restorana informacije o sastavu jela te informacije o potencijalnim alergenima su dobivene usmenim putem od djelatnika. Djelatnici su naveli kako u svom sastavu jela ne bi trebala sadržavati kikiriki te da stoga ne postoji ni mogućnost prisutnosti alergena kikirikija u tim jelima. Dobiveni rezultati analize pokazuju prisutnost alergena kikirikija u svim uzorcima i to u koncentracijama višim od $1,00 \text{ mgkg}^{-1}$ što znači kako dobivene informacije o uzorcima nisu u skladu sa dobivenim analitičkim rezultatima.

Informacije o mogućnosti prisutnosti tragova kikirikija u uzorcima koji su nabavljeni u trgovačkim lancima su navedene na samom pakiranju proizvoda, odnosno navodi o mogućoj prisutnosti kikirikija nalaze se kao dio deklaracije proizvoda (tablica 15).

Tablica 15. Navodi u okviru informacija o hrani analiziranih uzoraka gotovih jela iz trgovačkih lanaca vezani uz prisutnost alergena kikirikija

UZORAK	NAVOD NA DEKLARACIJI
GT1	“Može sadržavati tragove orašastih plodova, mlijeka, soje, jaja i sezama.”
GT2	“Može sadržavati tragove orašastih plodova, mlijeka, celera, soje, jaja i sezama.”
GT3	/
GT4	“ Može sadržavati GLUTEN, SOJU i SEZAM u tragovima.”

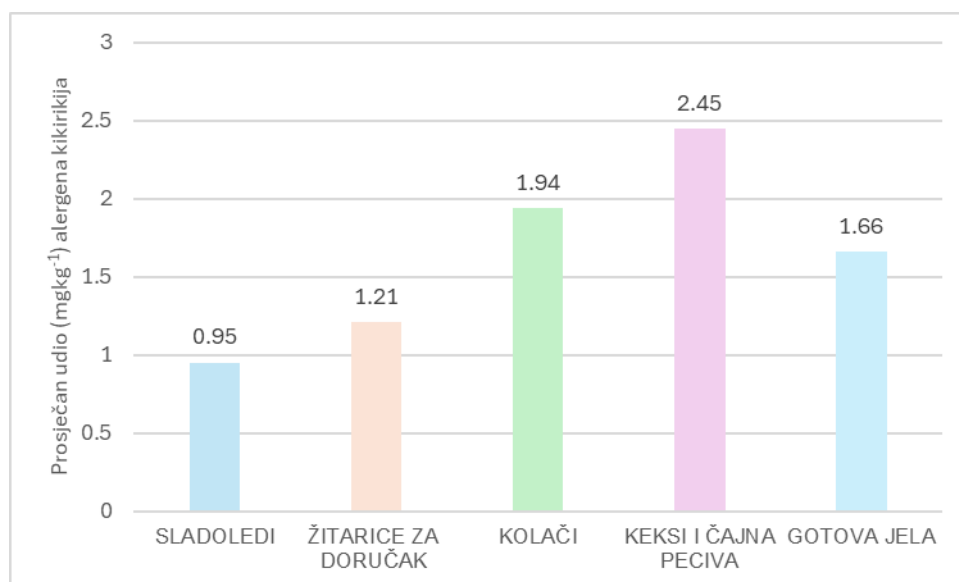
U slučaju jednog uzorka (tablica 15) nije navedeno kako može sadržavati kikiriki ili tragove kikirikija, dok uzorci GT1 i GT2 imaju navedeno kako mogu sadržavati tragove orašastih plodova. Analitički rezultati za uzorak GT3 ispod su limita detekcije korištene metode, što je sukladno s navodima na pakiranju, a što nije slučaj kod većine uzoraka. Za uzorak GT4 navodi vezani uz mogućnost prisutnosti alergena kikirikija i orašastih plodova/voća ne podudaraju se sa dobivenim analitičkim vrijednostima ($0,75 \text{ mgkg}^{-1}$), te bi stoga bilo potrebno provesti dodatna ispitivanja i analize. Trenutno dostupni komercijalni ELISA testovi za detekciju alergena kikirikija temelje se na poliklonskim antitijelima za Ara h1 protein (Schubert-Ullrich i sur., 2009). Ara h1 protein je idealan antigen za otkrivanje tragova kikirikija (Pomes i sur., 2003) i pripada skupini vicilina, odnosno proteina sjemenki, zbog čega je sličan proteinima drugih mahunarki (poput graha, graška i soje). Ta sličnost može dovesti do križne reaktivnosti antitijela s proteinima drugih mahunarki, što može rezultirati lažno pozitivnim rezultatima. Istraživanja su pokazala da je minimalna doza koja izaziva alergijsku reakciju oko 4 do 5 mg kikirikija, ali i manje količine mogu izazvati osip i subjektivne simptome alergijske reakcije kod predisponiranih pojedinaca (Schubert-Ullrich i sur., 2009).

Objekti javne prehrane, kao subjekti koji se bave hranom, nude nepretpakiranu hranu te, sukladno Uredbi (EU) br. 1169/2011, moraju obavijestiti potrošače o mogućoj prisutnosti svih alergena, bilo pisanim ili usmenim putem (Uredba, 2011). U Hrvatskoj je od 13. prosinca 2014. na snazi Pravilnik o informiranju potrošača o nepretpakiranoj hrani (Pravilnik, 2014), koji definira opća načela, zahtjeve i odgovornosti poslovnih subjekata s hranom vezano za informacije o nepretpakiranoj hrani, uključujući informacije o tvarima koje mogu izazvati alergije ili

netolerancije. Svi sastojci ili pomoćne tvari korištene tijekom proizvodnje ili pripreme hrane, a koje su prisutne u konačnom proizvodu i mogu izazvati alergije ili netolerancije, moraju biti navedeni u popisu sastojaka.

Informacije o alergenima mogu se također pružiti usmeno, uz uvjet da postoji jasno vidljiva obavijest koja upućuje na mjesto gdje se informacije mogu dobiti ili koja poziva potrošače da se obrate osoblju za informacije o prisutnosti alergena. Ta obavijest mora biti lako uočljiva, čitljiva i, gdje je primjenjivo, trajna. Također, informacije moraju biti dostupne u pisanom ili elektroničkom obliku u objektu gdje se hrana prodaje, kako bi na zahtjev bile lako dostupne potrošačima i inspekcijama, te moraju biti dostupne prije nego što je hrana ponuđena na prodaju (Pravilnik, 2014). Prema Uredbi (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani (Uredba, 2011), subjekti u poslovanju s hranom moraju označiti alergene na popisu sastojaka. Međutim, ako analizirani proizvodi ne sadrže kikiriki kao sastojak, subjekti nisu obvezni označavati prisutnost kikirikija kao alergena. Budući da odgovornost snosi subjekt u poslovanju s hranom koji je naveden na ambalaži, odluka o navođenju potencijalnih alergena u tragovima je proizvoljna.

Prosječne vrijednosti dobivenih rezultata za sve skupine uzoraka analizirane tijekom ovog istraživanja, odnosno prosječan udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija određen ELISA metodom u uzorcima sladoleda ($n = 8$), žitarica za doručak ($n = 8$), kolača ($n = 8$), keksa i čajnih peciva ($n = 8$) te gotovih jela ($n = 8$) nabavljenih u objektima javne prehrane i trgovačkim lancima prikazan je na slici 9.



Slika 9. Prosječan udio (mgkg^{-1}) alergena kikirikija u analiziranim uzorcima sladoleda ($n = 8$), žitarica za doručak ($n = 8$), kolača ($n = 8$), keksa i čajnih peciva ($n = 8$) te gotovih jela ($n = 8$)

Iz grafičkog prikaza (slika 8) je vidljivo kako je najviši udio alergena kikirikija određen u skupini keksa i čajnih peciva ($2,45 \text{ mgkg}^{-1}$), dok je najniži udio određen u uzorcima sladoleda ($0,95 \text{ mgkg}^{-1}$).

Prema zakonskim okvirima Republike Hrvatske i Europske unije, označavanje alergena kikirikija na prehrambenim proizvodima strogo je regulirano. Europska Uredba (EU) br. 1169/2011 o informiranju potrošača o hrani nalaže da svi prehrambeni proizvodi, uključujući gotova pretpakirana jela, moraju jasno označiti prisutnost kikirikija kao alergena. Ova Uredba zahtijeva da se alergeni istaknu u popisu sastojaka na deklaraciji proizvoda, s naglaskom na fontu koji omogućuje lakšu vidljivost potrošačima (Uredba, 2011). Za nepretpakirana jela, kao što su ona u restoranima ili pekarnicama, isti standardi primjenjuju se putem informacija dostupnih potrošačima. Prema Zakon o informiranju potrošača o hrani (Zakon, 2013) koji usklađuje hrvatske propise s europskim normama, subjekti u poslovanju hranom moraju pružiti jasne informacije o prisutnosti alergena u jelima koja nisu pakirana, bilo putem izložbenih oznaka ili izravno od osoblja. Ovo osigurava da potrošači, osobito oni s alergijama, mogu donijeti informirane odluke o potrošnji hrane.

Proizvođači često koriste oznaku "može sadržavati" kada ne mogu sa sigurnošću isključiti prisutnost alergena u svojim proizvodima. Iako je ovaj preventivni pristup zamišljen da zaštiti potrošače, može dovesti do nepotrebnih ograničenja u njihovoj prehrani (Spanjersberg i sur., 2010). To je posebno važno uzeti u obzir kod alergija na kikiriki, gdje postoji značajna individualna varijabilnost u količinama alergena koje mogu izazvati reakcije kod osjetljivih osoba (Taylor i sur., 2002; Hourihane i sur., 1997). Predvidjeti kada izostaviti ovakvo upozorenje ili kako označiti minimalnu kontaminaciju alergenom predstavlja izazov za proizvođače. U takvim slučajevima, deklariranje nenamjerne prisutnosti zakonski reguliranih alergena trebalo bi biti utemeljeno na detaljnoj analizi opasnosti i procjeni pripadajućih rizika (Puhač Bogadi, 2016; Spanjersberg i sur., 2010).

Oznake upozorenja o alergenima ne moraju nužno odražavati stvarnu prisutnost alergena u hrani. Ford i suradnici (2010) proveli su istraživanje s ciljem utvrđivanja učestalosti i razine kontaminacije proizvoda s upozorenjima o prisutnosti tri glavna alergena (jaja, mlijeka i kikirikija), te istražili razlike u riziku između proizvoda velikih i malih proizvođača, kao i razinu kontaminacije proizvoda bez takvih upozorenja. Uzorci pakiranih prehrambenih proizvoda prikupljeni su iz supermarketa u New Yorku i New Jerseyu. Istraživanje je obuhvatilo osam kategorija proizvoda s ili bez oznaka upozorenja o alergenima. Rezultati analize kontaminacije alergenima po kategorijama proizvoda bili su sljedeći: smjese za pečenje (5/80), čokolade

(4/68), slastice koje sadrže kikiriki (2/11), keksi (6/85), slane grickalice (2/81), žitarice (0/59), tjestenine (0/15) i smjese za palačinke (0/2). Kontaminacija alergenima po serviranjima iznosila je: jaja 0,084 do 0,26 mg, mlijeka 0,13 do 7,3 mg, a kikirikija 0,17 do 5,8 mg po serviranju. Istraživanje je pokazalo mjerljive razine alergena u 5,3 % proizvoda s upozorenjima i 1,9 % proizvoda bez upozorenja. Usporedbom proizvoda malih i velikih proizvođača, otkriveno je da su mali proizvođači imali kontaminaciju u 5,1 % proizvoda, dok su veliki proizvođači imali kontaminaciju u 0,75 % proizvoda. Utvrđeno je da 4,5 % proizvoda s upozorenjem sadrži mjerljive količine kikirikija, a prema procjeni rizika na temelju veličine serviranja, samo jedan od pet proizvoda prelazio bi dopuštenu granicu. Ovo istraživanje sugerira da alergični potrošači trebaju izbjegavati proizvode s oznakama upozorenja zbog potencijalnog rizika, te da budu oprezni s proizvodima bez takvih oznaka, osobito onima od malih proizvođača i onima iz kategorija s povećanim rizikom. Rezultati naglašavaju rizike za alergične potrošače i potrebu za većom sviješću među proizvođačima (Ford i sur., 2010).

Brojnim izazovima u okvirima navedene tematike pridonose i rezultati mnogobrojnih istraživanja. Tako su Furlong i sur. (2001) proučavali alergijske reakcije na kikiriki i orašaste plodove u hrani kupljenoj u azijskim restoranima, slastičarnicama i pekarnicama. Istraživanje je provedeno putem telefonskih intervjua, koristeći upitnike za nasumično odabrane ispitanike iz registra SAD-a koji uključuje 709 osoba s prijavljenim alergijama na kikiriki i orašaste plodove. Podaci su prikupljeni za 156 slučajeva, od kojih je 29 prijavilo svoju prvu alergijsku reakciju. Najveći broj reakcija izazvao je kikiriki (67 %), zatim orašasti plodovi (24 %), dok su kombinacije kikirikija i orašastih plodova ili nepoznati uzroci činili 9 % slučajeva. Simptomi su se javljali već 5 minuta nakon izlaganja, a 27 % osoba imalo je teške posljedice.

Među 106 ispitanika s prethodno dijagnosticiranim alergijama, samo 45 % je obavijestilo ustanove o svojim alergijama. U 83 slučaja (78 %) zaposlenici su potvrdili prisutnost kikirikija ili orašastih plodova u konzumiranoj hrani, dok su alergeni bili skriveni i neprepoznatljivi u 50 % slučajeva. U 23 slučaja (22 %) došlo je do izlaganja zbog korištenja istog kuhinjskog posuđa. Kod preostalih 21 ispitanika, reakcije su izazvane kontaktom s kožom ili gutanjem hrane koja nije bila namijenjena njima, zbog ostataka hrane na stolovima, ljuski kikirikija na podu i blizine kuhinje stolu. Zaključak je da restorani, slastičarnice i drugi objekti javne prehrane predstavljaju značajan rizik za osobe s alergijama na kikiriki i orašaste plodove zbog mogućnosti križne kontaminacije i neočekivanih sastojaka u hrani (Furlong i sur., 2001).

Pele i sur. (2007) istraživali su prisutnost kikirikija u 544 proizvoda (uključujući kolače i čokolade) iz deset europskih zemalja (Austrija, Belgija, Bugarska, Češka, Mađarska, Poljska, Rumunjska, Slovačka i Nizozemska). Cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost između

analitičkih rezultata i informacija o alergenima kikirikija i lješnjaka navedenih na deklaracijama proizvoda. Većina proizvoda nije imala deklarirane alergene kikirikija ili lješnjaka, iako su mnogi nosili upozorenja o mogućoj nenamjernoj prisutnosti tih alergena u tragovima. Otkriveno je da 32 % proizvoda s upozoravajućom oznakom sadržava tragove kikirikija, dok je 25 % proizvoda bez takvih oznaka također bilo kontaminirano. Prag od 20 ppm korišten je za označavanje značajne kontaminacije. Razlika u učestalosti kontaminacije između proizvoda s upozoravajućim oznakama (17 %) i bez njih (11 %) nije bila velika. Za osobe alergične na kikiriki, rizik od pronalaska alergena bio je jedan na svakih šest konzumiranih proizvoda s upozoravajućom oznakom, dok je taj rizik za proizvode bez oznake bio jedan na svakih devet. Upozoravajuće oznake ("može sadržavati" i "prisutno u okolišu") bile su češće u starijim članicama Europske unije, gdje su se uglavnom odnosile na orašaste plodove (25 %) u usporedbi sa specifičnim alergenom poput kikirikija (20 %). Suprotna situacija primijećena je u zemljama koje su postale članice EU nakon 2004. godine, gdje je samo 5 % kolača nosilo upozorenja o prisutnosti orašastih plodova, dok je 44 % kolača imalo upozorenja o prisutnosti kikirikija. Petnaest uzoraka kolača i šest uzoraka čokolade s deklariranim sadržajem kikirikija analizirano je ELISA metodom. U osam uzoraka kolača i jednom uzorku čokolade nije otkrivena prisutnost kikirikija. Analizom uzoraka kolača bez deklariranog sadržaja kikirikija, ELISA metoda otkrila je tragove kikirikija u 68 uzoraka (23 %). Limit kvantifikacije iznosio je 0,7 mg/kg. Od tih 68 pozitivnih uzoraka, približno 47 % imalo je sadržaj kikirikija veći od 20 mg/kg. Rezultati studije pokazali su da su tragovi alergena kikirikija i lješnjaka češće prisutni u proizvodima s oznakom "može sadržavati" u usporedbi s proizvodima bez takvih oznaka. Kod čokolade, veći sadržaj lješnjaka (>20 mg/kg) pronađen je u onima s oznakom "može sadržavati", dok kod kolača to nije bio slučaj. Što se tiče kikirikija, nije utvrđena povezanost između većih količina kikirikija (>20 mg/kg) i oznake "može sadržavati" (Pele i sur., 2007).

Zagon i sur. (2015) proveli su istraživanje unutar francuskog projekta "MIRABEL" kako bi identificirali prisutnost tragova proteina kikirikija u 899 uzoraka pakirane hrane koja nije deklarirana da sadrži kikiriki. Uzorci su klasificirani u deset prehrambenih kategorija: pahuljice, pločice od žitarica, kruh i pekarski proizvodi, pizza, kremasti deserti, mousse i svježi deserti, keksi i peciva, čokoladne pločice, čokoladni namaz, ostali čokoladni proizvodi i sladoled. Tri različite metode detekcije korištene su za analizu uzoraka. Prva metoda, lateralni protočni imunoesej, imala je granicu detekcije od 2 mg/kg kikirikija ili 0,5 mg/kg proteina kikirikija. Rezultati su pokazali da je 139 uzoraka bilo pozitivno, što je potvrđeno drugom metodom, real-time PCR-om. Uzorci koji su bili pozitivni na obje metode dodatno su analizirani ELISA testom. ELISA test je pokazao da samo 1 % uzoraka (9 od 899) sadrži mjerljive količine proteina kikirikija. U šest uzoraka pronađeno je manje od 5 mg ukupnih proteina kikirikija, dok su dva uzorka imala između 8 i 10 mg/kg, a jedan uzorak maksimalno 20 mg/kg. Zaključak istraživanja

je da su korištene metode iznimno učinkovite za detekciju tragova kikirikija, budući da mogu otkriti količine manje od 2 ppm (Zagon i sur., 2015).

Thomas i Mills (2006) proveli su istraživanje putem online upitnika kako bi utvrdili koje nutritivne informacije potrošači smatraju ključnima na jelovnicima restorana. Među 322 sudionika, 316 je istaknulo važnost detaljnog popisa sastojaka. Odgovori su varirali ovisno o prehranbenim navikama sudionika. Vegani i vegetarijanci naglasili su važnost informacija o upotrebi namirnica životinjskog podrijetla u pripremi jela. Osobe koje vode računa o zdravlju posebno su cijenile informacije o dodanom šećeru (bitno za dijabetičare), te sadržaju masti, soli i kolesterola (važni za osobe s hipertenzijom i koronarnim bolestima), kao i energetske vrijednosti hrane (važna za kontrolu pretilosti). Alergije su također bile značajan faktor pri odabiru hrane. Devet ispitanika istaknulo je kako je važno da hrana koja potencijalno sadrži alergene bude jasno označena. Proces pripreme hrane također je naglašen kao bitan jer može utjecati na prisutnost alergena. Potrošači s alergijama, specifičnim zdravstvenim problemima ili posebnom prehranom smatraju da nedostatak informacija na jelovnicima restorana može ugroziti njihovo zdravlje. Također su istaknuli važnost informiranosti osoblja restorana koje bi trebalo gostima pružiti relevantne informacije o potencijalnim alergenima (Thomas i Mills, 2006).

Robertson i sur. (2013) proveli su istraživanje u kojem su analizirali 38 pakiranih prehrambenih proizvoda prikupljenih s različitih lokacija u Irskoj, a analiziranih u Lincolnu, SAD. Ovi proizvodi su klasificirani u kategorije poput pekarskih proizvoda, keksa, žitnih pločica, čokolade i nutritivnih pločica. Među analiziranim proizvodima, 30 je imalo različite upozoravajuće oznake, dok je 8 sadržavalo kikiriki ili orašaste plodove navedene kao sporedne sastojke. U istraživanju je utvrđeno da je 21 od 38 proizvoda (55 %) imalo oznaku "Može sadržavati" kao najčešći oblik upozorenja o prisutnosti alergena. Primjenom ELISA metode, u nijednom od 13 proizvoda s upozorenjem o prisutnosti orašastih plodova nisu pronađeni tragovi kikirikija. Kikiriki je otkriven u 2 od 38 (5,3 %) proizvoda, uključujući 2 od 25 (8 %) proizvoda s upozorenjem koje se odnosi na kikiriki. U jednoj od tri različite serije čokoladnih pločica, detektirana je razina kikirikija od 25,8 mg/kg, što odgovara dozi od 0,52 mg kikirikija po predloženoj veličini serviranja. Ovaj proizvod je imao upozorenje "Može sadržavati tragove kikirikija". U četiri serije žitnih pločica, razine kikirikija su varirale od 2,8 do 7,4 mg/kg, s dozama po serviranjima između 0,14 i 0,33 mg kikirikija. Ove pločice imale su upozorenje "Proizvedeno u istom objektu", što je ukazivalo na potencijalnu prisutnost kikirikija. Samo jedan proizvod imao je oznaku "Proizvedeno na zajedničkoj opremi", što je pokazalo da je takav oblik upozorenja rjeđi u Irskoj nego u SAD-u. Proizvodi koji su imali kikiriki ili orašaste plodove navedene kao sporedne sastojke nisu sadržavali mjerljive količine kikirikija. Rezultati istraživanja pokazuju da su razine kikirikija u

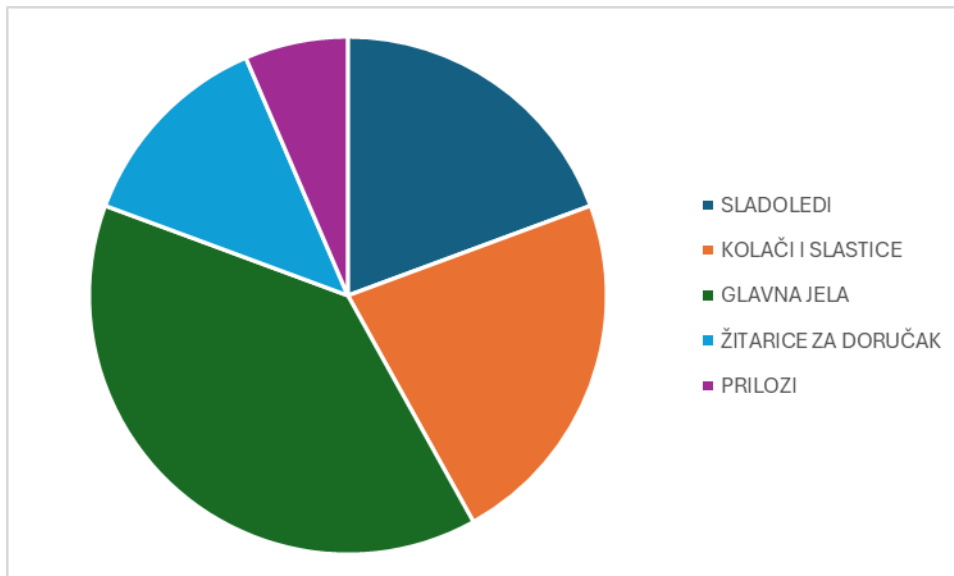
proizvodima s upozorenjima u Irskoj niže nego u drugim zemljama EU.

Kvantitativna procjena rizika sugerira da bi vrlo mali postotak populacije alergične na kikiriki mogao imati alergijsku reakciju na ove proizvode, dok bi većina proizvoda s upozorenjima bila sigurna za alergičnu populaciju (Robertson i sur., 2013).

Poms i sur. (2004) naglašavaju da bi granice detekcije alergena kikirikija trebale biti 1 mgkg^{-1} ili niže. Studija Morisset i suradnika (2003) preporučuje višu granicu detekcije, od 24 mgkg^{-1} za hranu i 5 mgkg^{-1} za ulje. Trenutno su metode s granicom detekcije od 1 do 5 mgkg^{-1} najprihvatljivije (Kiening i sur., 2005).

4.3. ANALIZA PRUŽANJA INFORMACIJA POTROŠAČIMA O ALERGENIMA KIKIRIKIJA U NEPRETPAKIRANOJ HRANI

Kod obroka posluženih u objektima javne prehrane kao što su restorani, te na štandovima ili putem dostave, isticanje alergena je otežano. U tu svrhu su tijekom ovog istraživanja dodatno analizirane dostupne mrežne stranice objekata javne prehrane te na taj način pružene informacije potrošačima o alergenima kikirikija u nepretpakiranoj hrani. Analizirano je ukupno 25 jelovnika dostupnih na mrežnim stranicama, te je ustanovljeno kako 13 od 25 objekata pruža na taj način informacije potrošačima o prisutnosti alergena. U okviru jelovnika objekata javne prehrane koji imaju dostupne navode o mogućoj prisutnosti alergena te navedene sve sastojke svakog pojedinog jela, najčešće je navedena mogućnost sadržaja jaja, mlijeka i soje, dok su navodi za alergen kikirikija znatno manje zastupljeni. Pri tome, od jela uz koja postoji navod vezan uz mogućnost prisutnosti alergena kikirikija (slika 10) najzastupljeniji su deserti poput sladoleda, palačinka te krema koje sadrže čokoladu. Nadalje, navode sadrže varivo od slanutka, pikantna piletina s povrćem i tjesteninom u woku, biftek u umaku od brusnice, njoki *pesto genovese*, umak *chilli* slatki, te žitarice za doručak.



Slika 10. Skupine jela koja, u okviru dostupnih jelovnika na mrežnim stranicama objekata javne prehrane, sadrže navod o prisutnosti alergena kikirikija

Skupine jela koja, u okviru dostupnih jelovnika na mrežnim stranicama objekata javne prehrane, sadrže navod o prisutnosti alergena kikirikija obuhvaćaju jela koja i obzirom na literaturne podatke mogu sadržavati tragove potencijalnih alergena kikirikija (Lange i sur., 2021; Brough i sur., 2014; McKenna i Klantz, 1997). Navedena jela ujedno predstavljaju skupine prehrambenih proizvoda u okviru kojih su, u prvom dijelu ovog istraživanja, prikupljeni uzorci i analizirani ELISA metodom.

Uočeno je kako ne postoji uniformnost navođenja alergena kod svih objekata javne prehrane. Propisi upućuju i na alternativne načine informiranja potrošača o alergenima uključujući: vidljive, jasno čitljive obavijesti koje potiču potrošače da se za informacije o alergenima obrate osoblju, dostupnost pisanih informacija u objektu kako bi na zahtjev bile lako dostupne potrošačima i nadležnim inspekcijama, pružanje informacija prije nego što je hrana ponuđena na prodaju bez dodatnih troškova za potrošače. Potrebno je voditi računa i o tome da se kikiriki ne ubraja u skupinu orašastih plodova nego u leguminoze te se stoga prema Pravilniku o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane (Pravilnik, 2011) nalazi u zasebnoj skupini alergena (Kikiriki i proizvodi od kikirikija), te obzirom na tu činjenicu navodi o mogućoj prisutnosti drugih orašastih plodova ne obuhvaćaju kikiriki.

5. ZAKLJUČCI

S obzirom na dobivene rezultate i provedenu raspravu, može se zaključiti slijedeće:

1. U svrhu određivanja alergena kikirikija primijenjena je imunoenzimska ELISA metoda. Alergeni kikirikija detektirani su u 19 od ukupno 20 analiziranih uzoraka sladoleda, žitarica za doručak, kolača, keksa i čajnih peciva te gotovih jela iz slastičarnica, odnosno objekata javne prehrane kao što su restorani pri čemu informacije o hrani analiziranih nepretpakiranih uzoraka nisu sadržavale informacije vezane uz prisutnost alergena kikirikija, osim u slučaju jednog uzorka žitarica za doručak (ŽS1) za koji je bila navedena mogućnost prisutnosti tog alergena.
2. Od ukupno 20 analiziranih uzoraka sladoleda, žitarica za doručak, kolača, keksa i čajnih peciva te gotovih jela iz trgovačkih lanaca, alergeni kikirikija detektirani su u 19 uzoraka, pri čemu informacije o hrani analiziranih pretpakiranih uzoraka nisu sadržavale informacije vezane uz prisutnost alergena kikirikija u slučaju jednog uzorka sladoleda (ST1), jednog uzorka kolača (KT3) te četiri uzorka gotovih jela (GT1, GT2, GT3, GT4), dok je ostalih 14 uzoraka sadržavalo informaciju o mogućnosti prisutnosti alergena kikirikija.
3. Najviši prosječan udio alergena kikirikija određen je u uzorcima keksa i čajnih peciva ($2,45 \text{ mgkg}^{-1}$), dok je najniži udio određen u uzorcima sladoleda ($0,95 \text{ mgkg}^{-1}$).
4. Analiza jelovnika dostupnih na mrežnim stranicama objekata javne prehrane kao što su restorani pokazala je da od dvadeset i pet svega trinaest pruža informacije potrošačima o alergenima kikirikija, obuhvaćajući pri tome jela odnosno nepretpakiranu hranu koja i obzirom na literaturne podatke može sadržavati tragove potencijalnih alergena kikirikija.

6. LITERATURA

- Anonymous (2015) ELISA - Principle, Types and Applications, <http://www.microbiologynotes.com/elisa-principle-types-and-applications> Pristupljeno 14. srpnja 2024.
- Aydin S (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* **72**, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Barre A, Borges J-P, Culerrier R, Rougé P (2005) Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes. *Immunol Lett* **100**, 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.03.014>
- Benjamini E, Leskowitz S (1991) Immunology: a short course, 2.izd., New York: Wiley-Liss.
- 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 XM, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, Sampson HA (2001) Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immun* **107**, 1077–1081. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.115480>
- Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA (2001) Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immun* **107**, 191–193. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.112031>
- Boutrif E (1995) FAO programmes for prevention, regulation and control of mycotoxins in food. *Nat. Toxins* **3**, 322-326. <https://doi.org/10.1002/nt.2620030430>
- Boye JI, Danquah AO, Thang CL, Zhao X (2012) Food allergens. U: Simpson BK, Nollet LML, Toldrá F, Benjakul S, Paliyath G, Hui YH (ured.) Food biochemistry and food processing, 2. izd., John Wiley & Sons, Inc., Danvers, str. 798-819.
- Brough HA, Turner PJ, Wright T, Fox AT, Taylor SL, Warner JO i sur. (2015) Dietary management of peanut and tree nut allergy: what exactly should patients avoid?. *Clin Exp Allergy* **45**(5), 859–871. <https://doi.org/10.1111/cea.12466>
- Bunyavanich S, Rifas-Shiman S, Platts-Mills TA, Workman L, Sordillo JE, Camargo CA i sur. (2014) Peanut, milk, and wheat intake during pregnancy is associated with reduced allergy and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* **133**(5), 1373–1382. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.040>

Burks AW (2008) Peanut allergy. *Lancet* **371**, 1538-1546. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60659-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60659-5)

Burks AW, Sampson HA, Bannon GA (1998) Peanut allergens. *Allergy* **53**, 725– 730. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1998.tb03967.x>

Butorac A, Marić M, Sabolović MB, Hruškar M, Brnčić SR, Družina VB (2013) Analitičke metode u forenzici hrane (pregledni rad), *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **8 (3-4)**, 90-101.

Car H (2017) Egzotično voće kroz brojke: Kikiriki-voće, povrće ili nešto treće? *Matka* **25 100**, 232-233.

Cellsignal (2001) Cell Signaling Technology, <https://www.cellsignal.com/applications/elisa/types-of-elisa-tests> Pristupljeno 29. kolovoza 2024.

Chen J, Xia L, Wu X, Yang S, Ji K, Liu Z i sur. (2012) A practical test system for sensitive, rapid screening and authentication of peanut allergens in imported and exported food products in Chinese Customs. *Food Control* **23**, 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.002>

Du Toit G, Roberts G, Sayre PH i sur. (2015). Randomized Trial of Peanut Consumption in Infants at Risk for Peanut Allergy. *N Engl J Med* **372(9)**, 803-813. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1414850>

Elegbede CF, Papadopoulos A, Gauvreau J, Crépet A (2015) A Bayesian network to optimise sample size for food allergen monitoring. *Food Control* **47**, 212-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.039>

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

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

Fielder R, Higgs W, Barden K (2010) Nutt allergen detection. U: Popping B, Diaz-Amigo C, Hoenicke KJ (ured.) *Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists*, Wiley & Sons, Inc, str. 377–406.

Ford LS, Taylor SL, Pacenza R, Niemann LM, Lambrecht DM, Sicherer SH (2010) Food allergen advisory labeling and product contamination with egg, milk, and peanut. *J Allergy Clin Immunol* **126**, 384-385. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.05.034>

Freeman AK, Morris NJ, Willich, RK (1954) Peanut butter, U.S. Dept. of Agriculture Bulletin AIC, str. 370.

Furlong TJ, DeSimonea J, Sicherer SH (2001) Peanut and tree nut allergic reactions in restaurants and other food establishments. *J Allergy Clin Immunol* **108**, 867–870. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.119157>

Goldman M (1998) Peanut allergy: how much peanut is too much? Baltimore, Md.: Asthma and Allergy Foundation of America, Maryland-Greater Washington, D.C., Chapter Newsletter.

Goodwin PR (2004) Food allergen detection methods: A coordinated approach. *J AOAC Int* **87(6)**, 1383–1390.

Grundy J, Matthews S, Bateman B, Dean T, Hasan Arshad S (2002) Rising prevalence of allergy to peanut in children: Data from 2 sequential cohorts. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 784 – 789. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.128802>

Hefle SL, Bush RK, Yunginger JW, Chu FS (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. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.5.419>

Hefle SL, Furlong TJ, Niemann L, Lemon-Mule H, Sicherer S, Taylor SL (2007) Consumer attitudes and risks associated with packaged foods having advisory labelling regarding the presence of peanuts. *J Allergy Clin Immunol* **120**, 171-176. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.04.013>

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

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

Hourihane JO (2011) Peanut allergy. *Pediatric Clinics of North America* **58**, 445 – 458. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2011.02.004>

Hourihane JO, Kilburn SA, Dean P, Warner JO (1997) Clinical characteristics of peanut allergy. *Clin Exp Allergy* **27(6)**, 634–639.

- Hourihane JO'B, Kilburn SA, Nordlee JA, Hefle SL, Taylor SL, Warner JO (1997) An evaluation of the sensitivity of subjects with peanut allergy to very low doses of peanut protein: A randomized, double-blind, placebo-controlled food challenge study. *J Allergy Clin Immun* **100**, 596–600. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(97\)70161-1](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(97)70161-1)
- Husain Z, Schwartz RA (2012) Peanut allergy: An increasingly common life-threatening disorder. *J Am Acad Dermatol* **66**, 136-143. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.02.031>
- Husain Z, Schwartz RA (2013) Food allergy update: more than a peanut of a problem. *Int J Dermatol* **52**, 286-294. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05603.x>
- Kang IH, Gallo M (2007) Cloning and characterization of a novel peanut allergen Ara h 3 isoform displaying potentially decreased allergenicity. *Plant Science* **172**, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.09.014>
- Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Flabbee J, Beaudouin E, Morisset M, Thevenin F (2001) Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immun* **108**, 133-140.
- Keating MU, Jones RT, Worley NJ, Shively CA, Yunginger JW (1990) Immunoassay of peanut allergens in food-processing materials and finished foods. *J Allergy Clin Immun* **86(1)**, 41–44. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(05\)80121-6](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(05)80121-6)
- Kiening M, Niessner R, Drs E, Baumgartner S, Krska R, Bremer M i sur. (2005) Sandwich immunoassays for the determination of peanut and hazelnut traces in foods. *J Agric Food Chem* **53(9)**, 3321–3327. <https://doi.org/10.1021/jf048394r>
- Kolaček S, Hosjak I, Niseteo T (2016) Prehrana u općoj i kliničkoj pedijatriji, Medicinska naklada. str. 157 – 162.
- Koppelman SJ, Vlooswijk RAA, Knippels LMJ, Hessing M, Knol EF, Van Reijssen FC i sur. (2001) Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different part of the world. *Allergy* **56**, 132–137.
- Koppelman SJ, Bleeker-Marcelis H, Duijn G, Hessing M (1996) Detecting peanut allergens. The development of an immunochemical assay for peanut proteins. *World of Ingredients* **12**, 35–38.
- Koppelman SJ, Hefle SL (2006) Detecting allergens in food, Woodhead Publishing, Cambridge.
- Kris-Etherton PM, Hu FB, Ros E, Sabate J (2008) The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *J Nutr* **38(9)**, 1746-1751. <https://doi.org/10.1093/jn/138.9.1746s>

Krska R, Welzig E, Baumgartner S (2004) Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. *Anal Bioanal Chem* **378**, 63–65. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2311-5>

Lange L, Klimek L, Beyer K, Blümchen K, Novak N, Hamelmann E i sur. (2021) White paper on peanut allergy - part 1: Epidemiology, burden of disease, health economic aspects. *Allergo J Int* **30**(8), 261–269. <https://doi.org/10.1007/s40629-021-00189-z>

Lehrer SB, Horner WE, Reese G (1996) Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev Food Sci Nutr* **36**(6), 553–564. <https://doi.org/10.1080/10408399609527739>

Lepp U, Zabel P, Schocker F (2002) Playing cards as a carrier for peanut allergens. *Allergy* **57**(9), 864. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.23575.7.x>

Leung DY, Sampson HA, Yunginger JW, Burks AW, Schneider LC, Wortel CH i sur. (2003) Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N Engl J Med* **348**(11), 986–993.

Levetin E, McMahon K (2008) *Plants and society*, 5. izd., The McGraw–Hill Companies, str. 212-213.

Maleki SJ, Viquez O, Jacks T, Dodo H, Champagne ET, Chung S-Y i sur. (2003) The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J Allergy Clin Immun* **112**, 190–195.

Mazzocchi A, Venter C, Maslin K, Agostoni C (2017) The Role of Nutritional Aspects in Food Allergy: Prevention and Management. *Nutrients* **9**, 850.

McKenna C, Klontz KC (1997) Systemic Allergic Reaction Following Ingestion of Undeclared Peanut Flour in a Peanut-Sensitive Woman. *Ann Allergy Asthma Immunol* **79**(3), 234-236. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63008-6](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63008-6)

Mikita CP, Padlan EA (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? *Med Hypotheses* **79**, 585–591.

Mondoulet L, Paty E, Drumare MF, Ah-Leung S, Scheinmann P, Willemot RM i sur. (2005) Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *J Agric Food Chem* **53**, 4547–4553.

Morisset M, Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Guenard L, Beaudouin E, Flabbee J i sur. (2003) Thresholds of clinical reactivity to milk, peanut, and sesame in immunoglobulin E-dependent

allergies: evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges. *Clin Exp Allergy* **33**, 1046–1051.

Mustorp S, Engdahl-Axelsson C, Svensson U, Holck A (2008) Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real time PCR. *Eur Food Res Technol* **226**, 771-778.

Muthukumar J, Selvasekaran P, Lokanadham M, Chidambaram R (2020) Food and food products associated with food allergy and food intolerance – An overview. *Food Res Int* **138**.

Nowak-Wegrzyn A (2006) Immunotherapy for food allergy. *Inflamm Allergy Drug Targets* **5**, 23-34.

O'B Hourihane J, Roberts SA, O Warner J (1998) Resolution of peanut allergy: case-control study. *BMJ* **316**, 1271-1275.

Ozias-Akins P, Breiteneder H (2019). The functional biology of peanut allergens and possible links to their allergenicity. *Allergy* **74**(5), 888–898.

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

Pomes A, Helm RM, Bannon GA, Burks AW, Tsay A, Chapman MD (2003) Monitoring peanut allergen in food products by measuring Ara h 1. *J Allergy Clin Immunol* **111**, 640-645.

Poms RE, Agazzi ME, Bau A, Brohee M, Capelletti C, Nørgaard J i sur. (2005) Inter laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate. *Food Addit Contam* **22**(2), 104 – 112.

Poms RE, Klein CL, Anklam E (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam* **21**, 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. *Crit Rev Food Sci Nutr* **56**, 2511-2542.

Pravilnik (2014) Pravilnik o informiranju potrošača o nepretpakiranoj hrani. *Narodne novine* **144**, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_12_144_2700.html Pristupljeno 28. lipnja 2024.

Pravilnik (2011) Pravilnik o označavanju, reklamiranju i prezentiranju hrane. *Narodne novine* **79**, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2011_06_63_1404.html Pristupljeno 28. lipnja 2024.

Puhač Bogadi N (2016) Upravljanje alergenima u prehrambenoj industriji. *Crolab*, str. 1 – 15 https://www.crolab.hr/userfiles/file/KAL/Puha_Bogadi_Upravljanje_alergenima_u_prehrambenoj_industriji.pdf Pristupljeno 10. srpnja 2024.

Remington BC, Baumert JL, Marx DB, Taylor SL (2013) Quantitative risk assessment of foods containing peanut advisory labeling. *Food Chem Toxicol* **62**, 179-187.

Robertson ON, Hourihane JO, Remington BC, Baumert JL, Taylor SL (2013) Survey of peanut levels in selected Irish food products bearing peanut allergen advisory labels. *Food Add. Contam.* **30**, 1467-1472.

Robison RG, Pongracic JA (2012) Chapter 23: Food allergy. *Allergy Asthma Proc* **33**, 77 – 79.

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

Sampson HA, Mendelson L, Rosen JP (1992) Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* **327**, 380–384.

Schubert-Ullrich P, Rudolf J, Ansari P i sur. (2009) Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal Bioanal Chem* **395**, 69–81.

Sicherer SH (2001) Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol* **108**(6), 881 – 890.

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

Sicherer SH, Sampson HA (2018) Food Allergy: A Review and Update on Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Management. *J Allergy Clin Immunol* **141**(1), 41-58.

Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Burks AW, Sampson HA (1999) Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States of America determined by a random digit dial telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* **103**, 559-562.

Skypala IJ, McKenzie R (2019) Nutritional Issues in Food Allergy. *Clin Rev Allergy Immunol* **57**, 166 – 178.

Spanjersberg MQI, Knulst AC, Kruizinga AG, Van Duijn G, Houben GF (2010) Concentrations of undeclared allergens in food products can reach levels that are relevant for public health. *Food Addit and Contam* **27**, 169 – 174.

Suhr M, Wicklein D, Lepp U, Becker W-M (2004) Isolation and characterization of natural Ara h 6: Evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat. *Mol Nutr & Food Res* **48**, 390–399.

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

Taylor SL, Hefle SL, Bindslev-Jensen C, Bock SA, Burks AW, Christie L i sur. (2002) Factors affecting the determination of threshold doses for allergenic foods: How much is too much? *J Allergy Clin Immun* **109**, 24–30.

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

Taylor SL, Nordlee JA, Niemann LM, Lambrecht DM (2009) Allergen immunoassays - considerations for use of naturally incurred standards. *Anal Bioanal Chem* **395**, 83-92.

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

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

Togias A, Cooper SF, Acebal ML i sur. (2017) Addendum Guidelines for the Prevention of Peanut Allergy in the United States: Report of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases-Sponsored Expert Panel. *J Allergy Clin Immunol* **139**(1), 29-44.

Uredba (2011) Uredba (EU) br. 116/2011 Europskog parlamenta i Vijeća. *Službeni list Europske unije* **304**, Europska unija.

Van Hengel AJ (2007) Food allergen detection methods and the challenge to protect foodallergic consumers. *Anal and Bioanal Chem* **389**, 111–118.

Wen H-W, Borejsza-Wysocki W, DeCory TR, Durst RA (2007) Peanut Allergy, Peanut Allergens, and Methods for the Detection of Peanut Contamination in Food Products. *Compr Rev in Food Sci and Food Safety* **6**, 47–58.

Wensing M, Penninks AH, Hefle SL, Koppelman SJ, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst, AC (2002) The distribution of individual threshold doses eliciting allergic reactions in a population with peanut allergy. *J Allergy Clin Immun* **110**(6), 915-920.

Whitaker TB, Williams KM, Trucksess MW, Slate AB (2005) Immunochemical analytical methods for the determination of peanut proteins in foods. *J AOAC Int* **88**, 161–174.

Yeung JM, Collins PG (1996) Enzyme immunoassay for the determination of peanut proteins in food products. *J AOAC Int* **79**, 1411–1416.

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

Young MC (2015) Taking the leap earlier: the timing of tolerance. *Curr Opin Pediatr* **27**, 736–740

Yu J, Mohawed SM, Bhatnagar D, Cleveland TE (2003) Substrate-induced lipase gene expression and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J Appl Microbiol* **95(6)**, 1334–1342.

Zagon J, Dittmer J, Elegbede CF, Papadopoulos A, Braeuning A, Crépet A i sur. (2015) Peanut traces in packaged food products consumed by allergic individuals: Results of the MIRABEL project. *J Food Compos Anal* **44**, 196-204.

Zakon (2023) Zakon o hrani. Narodne novine 18, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2023_02_18_302.html Pristupljeno 28. lipnja 2024.

Zakon (2016) Zakon o informiranju potrošača o hrani. Narodne novine 56, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2016_06_56_1449.html Pristupljeno 28. lipnja 2024.

Zeiger RS (2003) Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics* **111(6)**, 1662–1671.

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

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Iva Herceg izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis