

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

1126188

**METÓDY DETEKČIE LEPKU AKO ALERGÉNEJ
ZLOŽKY BIELKOVÍN**

2010

Lenka Hepalová

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
NÁZOV FAKULTY

METÓDY DETECKIE LEPKU AKO ALERGÉNEJ
ZLOŽKY POTRAVÍN

Bakalárska práca

Študijný program:	Bezpečnosť a kontrola potravín
Študijný odbor:	6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov
Školiace pracovisko:	Katedra hygieny a bezpečnosti potravín
Školiteľ:	Ing. Radoslav Židek, PhD.

Nitra 2010

Lenka Hepalová

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Lenka Hepalová vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Metódy detekcie lepku ako alergénnej zložky potravín“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 31. marca 2010

Lenka Hepalová

Pod'akovanie

Touto cestou chcem poďakovať môjmu školiteľovi Ing. Radoslavovi Židekovi, PhD., za podnetné rady, metodické usmernenie a pomoc pri vypracovaní bakalárskej práce.

Zároveň sa chcem poďakovať všetkým, ktorí sa akokýmkoľvek spôsobom podielali pri tvorbe tejto práce.

Abstrakt

V práci sa zaoberáme problematikou alergénov (konkrétne lepku) a ich detekcie v potravinách. Cieľom práce je popísať metódy, ktoré je možné použiť pri detekcii lepku v potravinách, legislatívu, ktorú je nutné dodržiavať, aby sa predišlo zdravotným problémom alergikov, najmä celiakov. Celiakia nie je typická potravinová alergia, ide o črevné ochorenie, pri ktorom pôsobením lepkových bielkovín prichádza k poškodzovaniu steny tenkého čreva a následne k nedostatočnému vstrebávaniu živín. Lepok hrá kľúčovú úlohu pri určovaní pekárenskej kvality pšenice. Proteíny lepku možno rozdeliť do dvoch hlavných frakcií v závislosti od ich rozpustnosti v roztoku alkoholu: gliadín rozpustný, glutelín nerozpustný. Hlavnou metódou na detekciu lepku je ELISA, ktorá využíva interakciu antigénu s protilátkou. Ďalšími metódami používanými na detekciu lepku sú: disptick test a LFA, biosenzor, elektroforéza, chromatografia, hmotnostná spektrometria – MALDI-TOF a PCR.

Kľúčové slová: lepok, ELISA, PCR

Abstract

In the article We handle the complication of allergens and their detection in the food. The intention of the article describes the methods, which can be used by the detection of the gluten in the food. The legislation has to be unbroken. Celiac disease is not typical allergy of food. It is the intestinal disorder, which influence of protein glutens comes to violations of the intestinal wall and nutrients cannot absorb. The gluten is important in the bakery. The gluten proteins can be divided into two main factions by solubility in the solution of alcohol solution: gliadins soluble, insoluble glutelins. The principal method of the detection of gluten is the ELISA, which make uses the interaction of antigen-antibody. Other methods are: dipstick test and LFA, biosensors, electrophoresis, chromatography, mass spectrometry – MALDI-TOF and PCR.

Keywords: gluten, ELISA, PCR

OBSAH

Slovník termínov a skratiek	3
Jedno- a troj- písmenový kód aminokyselín	5
Úvod	6
1 Cieľ práce.....	7
2 Metodika písania záverečnej práce	8
3 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky.....	9
3.1 Legislatíva upravujúca alergény v potravinách	9
3.2 Potravinová alergia	11
3.2.1 Výskyt potravinovej alergie	12
3.2.2 Priebeh potravinovej alergie	12
3.2.3 Klinické prejavy alergií.....	13
3.2.3.1 Ekzém, atopická dermatitída	13
3.2.3.2 Žihľavka	13
3.2.3.3 Astma.....	14
3.2.3.4 Orálny alergický syndróm	14
3.2.3.5 Anafylaktický šok.....	14
3.3 Alergia na obilie	14
3.3.1 Celiakia	15
3.4 Metódy stanovenia lepkových bielkovín v potravinách	17
3.4.1 Všeobecné požiadavky na detečnú metódu	19
3.4.2 Imunoanalytické metódy – ELISA	20
3.4.3 Imunoanalytické metódy – dipstick a LFA.....	24
3.4.4 Imunoanalytické metódy – biosenzory	25
3.4.5 Ďalšie metódy na zisťovanie lepkových bielkovín v potravinách	26
3.4.5.1 Elektroforetické metódy	26
3.4.5.2 Chromatografické metódy	27
3.4.5.3 Hmotnostná spektrometria – MALDI-TOF.....	28
3.4.5.4 Polymerázová reťazová reakcia.....	28
4 Návrh na využitie poznatkov.....	33
Záver	34
Zoznam použitej literatúry	36

Slovník termínov a skratiek

ACID-PAGE – kyslá elektroforéza.

Antigén (angl. antibody generating – protilátky tvoriaci) je označenie látky, najčastejšie bielkovinovej povahy, ktorá je schopná vyvolať špecifickú imunitnú odpoveď (Drápal et al., 2003).

Atopia je vrodená alebo genetická predispozícia k vzniku a rozvoju alergií (Poulsen, 2006). Podľa Drápala et al. (2003) taktiež tendencia k nadmernej produkcii protilátok triedy IgE ako odpoveď na nízke dávky alergénov. Výsledkom je vznik alergického zápalu s rozvojom typických atopických ochorení, napr. prieduškovej astmy, alergickej nádchy a zápalu spojiviek alebo atopický ekzém.

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – je imunoenzýmová metóda, pri ktorej sa látka (ligand) viaže špecifickým spôsobom na protilátku (Socha et al., 2010).

HPLC – high performance liquid chromatography - vysoko kvapalinová chromatografia.

IEF – isoelectric focusing – izoelektrická fokusácia – separovaná látka sa pohybuje vplyvom elektrického prúdu v gradiente pH až dovtedy, kým sa dostane do oblasti pH zhodného s jeho izoelektrickým bodom (Vrbová, 2006).

LFA – lateral-flow assay – testy s bočným prúdom.

PCR - polymerase chain reaction - polymerázová reťazová reakcia umožňuje selektívne zmnoženie určitého úseku DNA, pričom veľkosť amplifikovaného (zmnoženého) úseku je ohraničená primermi (Viglaský et al., 2000).

Potravinové alergény sú prevažne glykoproteíny, ktoré majú molekulovú hmotnosť 10 – 70 kDa a sú dobre rozpustné vo vode, sú odolné voči tepelnému zásahu, žalúdočným kyselinám a tráviacim enzýmom (Rauchová, Rauch, 1997).

Prahová dávka je najmenšie množstvo potravy, ktoré môže vyvolať objektívne alergické príznaky u najviac precitlivených jedincov. Prahová dávka je pre každého jedinca individuálna a závisí od stupňa precitlivenosti. Aj u konkrétneho jedinca môže prahová dávka kolísať v závislosti od okolností, ako napr. telesná námaha, požitie alkoholu, liekov ako je kyselina acetylsalicylová atď. (Etllová, s. a.).

Primer je oligonukleotid komplementárny ku koncom amplifikovanej sekvencie DNA (Javorský, 2003).

SDS-PAGE – Sodium DodecylSulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis – gelová elektroforéza s dodecyl sulfátom sodným.

RT-PCR – real time polymerase chain reaction – polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase.

Senzibilizácia je proces, pri ktorom dochádza na základe opakovaného kontaktu s alergénom k rozvoju abnormálnej imunitnej reakcii, k nárastu protilátok triedy IgE (Drápal et al., 2003).

Skrížená alergická reakcia vzniká na základe podobnosti alergénov, to znamená, že musí dôjsť ku vzájomnej zhode v sekvencii aminokyselín alergénov rôznych potravín, alebo potraviny a inhalačného alergénu napr. peľ, latex (Moláková, 2008). Skrížená reaktivita medzi peľmi a potravinami sa vyskytuje u starších detí so senzibilizáciou na peľ. U týchto detí dochádza najprv k rozvoju alergickej rinokonjunktivitídy v reakcii na peľ stromov a tráv a neskôr k rozvoju pridružených potravinových alergií (Zuberbier, Ree, 2006).

Tkanivová transglutamináza je enzým vyskytujúci sa vo vnútri endomyzia (spojivové tkanivo okolo hladkého svalu), katalyzuje zosieťovanie proteínov v extracelulárnej časti v časti tkanív, aj v intracelulárnom cytoskelete a pravdepodobne zohráva úlohu pri formovaní granulačných tkanív, apoptóze, čiže programovej smrti bunky a raste nádorov. Tento enzým má kľúčovú úlohu v patogenéze celiakálneho ochorenia (Socha et al., 2010).

2 – rozmerná elektroforéza (2D elektroforéza) pri použití tejto metódy sa molekuly delia v dvoch smeroch. V prvom smere sa molekuly delia na základe kompaktného zabalenia a v druhom smere (ktorý je kolmý na prvý), dochádza k separácii na základe konformačných zmien (pôsobenie interkalátora) (Sedlák et al., 2007).

Jedno- a troj- písmenový kód aminokyselín

A	Ala	Alanín
B	Asx	Kyselina asparágová / asparagín
C	Cys	Cysteín
D	Asp	Kyselina asparágová
E	Glu	Kyselina glutámová
F	Phe	Fenylalanín
G	Gly	Glycín
H	His	Histidín
I	Ile	Izoleucín
K	Lys	Lyzín
L	Leu	Leucín
M	Met	Metionín
N	Asn	Asparagín
P	Pro	Prolín
Q	Gln	Glutamín
R	Arg	Arginín
S	Ser	Serín
T	Thr	Treonín
U	Sec	Selenocysteín
V	Val	Valín
W	Trp	Tryptofán
X	Xaa	neznáma, resp. „iná“ aminokyselina
Y	Tyr	Tyrozín
Z	Glx	kyselina glutámová / glutamín

Úvod

Obilniny (najmä pšenica) sú jednou z najdôležitejších surovín, ktoré človek konzumuje, obsahujú dôležité sacharidy nevyhnutné pre život, ale taktiež alergény. Jedným z hlavných alergénov v obilninách je lepok. Lepok je komplex zásobných bielkovín, ktorý po navlhčení vytvára súvislú mriežku a hrá dôležitú úlohu v určovaní pekárenskej kvality obilnín. Hlavnými komponentami lepku sú glutelíny a gliadín.

Celiakia, glutén senzitivna enteropatia, je systémová choroba, ktorá po požití lepku spôsobuje poškodenie steny tenkého čreva, ktoré môže viesť k úplnej atrofii črevných klkov. Celiakia nezahŕňa imunitný systém, preto ju nemôžeme považovať za typickú potravinovú alergiu. Príznaky, ktoré je možné sledovať u osôb postihnutých celiakiou, zahŕňajú typické prejavy alergie na potravinu, hnačky, bolesti kostí, v niektorých prípadoch chudokrvnosť a kožnú vyrážku.

Jedinou liečbou celiakie je dodržiavanie celoživotnej bezlepkovej diéty. Pri bezlepkovej diéte je potrebné zo stravy vylúčiť potraviny obsahujúce lepok, ľudia postihnutí touto chorobou nemôžu konzumovať výrobky, pri príprave ktorých boli použité pšenica, raž, jačmeň a v našich podmienkach i ovos.

V posledných rokoch sa zvýšil záujem o potravinové alergény, čo viedlo k rastúcemu dopytu po spoľahlivých, rýchlych a citlivých metódach. Alergény v potravinách môžu byť prítomné v celej rade rozličných foriem, ktoré sa môžu líšiť svojím chemickým a fyzikálnym zložením a tiež technologickým procesom výroby. Niektoré zložky v potravinách môžu narúšať signál vydávaný alergénom alebo ho môžu úplne potlačiť. Citlivosť metódy použitej na detekciu je veľmi dôležitá, lebo aj veľmi malé množstvo alergénu môže vyústiť u citlivého jedinca k alergickej reakcii, ktorá môže v najhoršom prípade skončiť aj smrťou.

Najpoužívanejšou metódou na detekciu lepku v potravinách je sendvičová ELISA. Táto metóda je založená na reakcii antigén – protilátka a vytvorenie komplexu. ELISA s použitím protilátky R5 je referenčnou metódou v Codex Alimentarius.

Ďalšími metódami využívanými na detekciu lepkových bielkovín sú dipstick testy, biosenzory, elektroforetické metódy, chromatografické metódy a hmotnostná spektrometria. Ďalšou často využívanou metódou je plymerázová reťazová reakcia – PCR. Princípom tejto metódy je detekcia DNA rastliny v potravinách, pričom sa využíva súbor po sebe nasledujúcich krokov.

1 Cieľ práce

Cieľom práce bolo zhodnotiť súčasné možnosti testovania prítomnosti lepku v potravinách prostredníctvom dostupných analytických metód. Navrhnuť najvhodnejší a najlacnejší systém detekcie pre podmienky slovenského trhu.

2 Metodika písania záverečnej práce

Metodika písania záverečnej práce bola rozdelená do viacerých fáz:

Prvá fáza – vytvorenie všeobecného teoretického základu o problematike detekcie lepku, pozostávajúci z terminológie, rozdelenia a legislatívy týkajúcej sa alergénov.

Druhá fáza – popísanie známych metód používaných na detekciu prítomnosti lepku v potravinách.

Tretia fáza – zhodnotenie metód s dôrazom na ich využitie na slovenskom trhu.

Harmonogram:

Rok 2009

- stanovenie cieľa práce a zhromaždenie literárnych zdrojov
- spracovanie a sumarizovanie literárnych zdrojov

Rok 2010

- záverečné úpravy bakalárskej práce, zoznam citovaných autorov podľa platnej ISO normy
- návrh na použitie výsledkov, záver, konzultácie so školiteľom ukončenie práce

3 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

3.1 Legislatíva upravujúca alergény v potravinách

Ministerstvo pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky vydali podľa § 3 ods. 1 a § 30 ods. 1 zákona Národnej rady Slovenskej republiky č. 152/1995 Z. z. o potravinách Výnos z 26. októbra 2005 č. 3493/2005-100, ktorým sa mení a dopĺňa Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky z 28. apríla 2004 č. 1187/2004-100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín v znení neskorších predpisov (oznámenie č. 265/2004 Z. z.).

Príloha č. 3 k druhej hlave druhej časti potravinového kódexu, obsahujúca hlavné alergény, ktoré podľa odporúčania EU (Codex alimentarius) podliehajú povinnému vyznačeniu na potravine, sú to tie, ktoré aj v minimálnom množstve môžu vyvolať závažnú (fatálnu) alergickú reakciu:

1. Obilie obsahujúce glutén (t. j. pšenica - 200 µg, raž, jačmeň, ovos, špalda, kamut a vysľachtené odrody z nich),
2. kôrovce a výrobky z kôrovcov,
3. vajcia (0,002–1 mg) a výrobky z vajec
4. ryby a výrobky z rýb,
5. podzemnica olejná a výrobky z podzemnice olejnej,
6. sója (0,7–50µg) a výrobky zo sóje,
7. mlieko (0,02 ml – 0,005 mg) a výrobky z mlieka vrátane laktózy,
8. orechy, t. j. mandle (*Amygdalus communis L.*), lieskovce (*Corylus avellana*), vlašské orechy (*Juglans regia*), kešu (*Anacardium occidentale*), pekanové orechy (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), brazílske orechy (*Bertholletia excelsa*), pistácie (*Pistacia vera*), makadamské orechy a queenslandské orechy (*Macadamia ternifolia*) a výrobky z orechov,
9. zeler a výrobky zo zeleru,

10. horčica a výrobky z horčice,

11. sezamové semená a výrobky zo sezamových semien,

12. oxid siričitý a siričitany o koncentrácii viac ako 10 mg/kg alebo 10 mg/l vyjadrenej ako oxid siričitý (SO₂).

Smernica 2000/13/ES zaväzuje výrobcu uvádzať v údajoch o zložení výrobku iba tie zložky, ktorých obsah je vyšší ako 25%, tzv. „pravidlo 25%“. Toto pravidlo bolo zavedené do EÚ legislatívy pred viac ako 20 rokmi, v snahe skrátiť príliš dlhé zoznamy zložiek na výrobkoch.

Smernica 2003/89/ES novelizuje smernicu 2000/13/ES, ktorá by mala zaručiť, že sa osoby trpiace potravinovou alergiou budú môcť chrániť pred konzumáciou tzv. „skrytých alergénov“ v potravinách. Pravidlo „25%“ bolo s definitívnou platnosťou zrušené. Podľa novej právnej úpravy, každá zložka použitá pri výrobe potravín prítomná v hotovom výrobku hoci aj v zmenenej forme, ktorá je uvedená, alebo ktorá pochádza zo zložky uvedenej v zozname alergénov (12 alergénov), bude vyznačená na etikete s jednoznačným odkazom na názov tejto zložky.

Ak ide o nápoje obsahujúce viac ako 1,2 objemového percenta alkoholu, v ktorých sa nachádza zložka zahrnutá v zozname alergénov (12 alergénov), musí byť táto uvedená v označení slovom „obsahuje“, za ktorým sa uvedie názov príslušnej zložky. Takéto označenie sa nemusí uvádzať, ak zložka je už uvedená v zozname zložiek alebo názvov nápoja (Výnos MPSR a MZSR č. 1187/2004 – 100).

Na minimalizáciu rizika v dôsledku neúmyselnej kontaminácie je dôležité si uvedomiť nasledovné (Úradný vestník L 308, 2003):

- Potrebu neustále školiť zamestnancov spoločností, pričom vzdelávanie by malo vždy zahŕňať aj vedomosti z oblasti alergénov.
- Riziká pochádzajúce z alergénov by sa mali preskúmať vo všetkých častiach reťazca, od nákupu, cez príjem, manipuláciu a skladovanie surovín a finálnych výrobkov.
- Pri vývoji nových výrobkov a receptúr, by sa každá surovina mala starostlivo identifikovať a ohodnotiť.
- Mala by byť urobená kompletná špecifikácia výrobku. Treba poznamenať, že alergény môžu byť niekedy prítomné ako sub-komponent suroviny, aditíva, atď., napr. ako nosič v koreniacej zmesi.

-
- Dobré výrobné postupy by mali využívať rework (interne recyklovaný výrobok). Je nevyhnutné, aby rework bol používaný v príslušných výrobkoch a nie v ostatných výrobkoch.
 - Využívanie priestorov a zariadení by malo byť naplánované tak, aby sme predišli kontaminácii medzi výrobkami, výrobnými linkami a pracovnými nástrojmi.
 - Čistením by sa mali odstrániť všetky alergické zložky zo zariadení, skladov a ostatných priestorov, v ktorých sa manipuluje s potravinami.
 - Výrobcovia by mali zabezpečiť, že výrobky budú zabalené v správnom balení zoznam zloženia bude vždy odrážať skutočné zloženie výrobku.
 - Balenie surovín, polovýrobov a hotových výrobkov by malo byť také, aby nedochádzalo k nebezpečenstvu zámeny. Treba mať na mysli, že ku kontaminácii výrobku alergénmi môže tiež dochádzať po výrobe, napríklad pri manipulácii s polovýrobnými výrobkami, ak ešte neboli zabalené do finálneho balenia.
 - Keď je to nevyhnutné, výrobky by sa mali podrobiť po-výrobnej kontrole, aby sme sa uistili, že nedošlo k zavedeniu alergénov do výrobku.
 - Keď sa zmení vyrábaný výrobok, výroba alebo postup, všetky spomenuté body musia byť nanovo preskúmané.

Smernica 2007/68/ES uvádza konečný platný zoznam alergénnych súčastí potravy, ktoré sa musia uvádzať na obale, aby sa spotrebiteľ vyhol konzumácii zložiek, ktoré u neho môžu vyvolať alergickú reakciu.

3.2 Potravinová alergia

Podľa Drápala at al. (2003) potravinová precitlivosť spôsobuje objektívne reprodukovateľné príznaky, provokované expozíciou sa definovanej potravy (potravinovému alergénu alebo zložke potravy) v dávke tolerovanej zdravými jedincami.

Najčastejšie sa stretávame s nasledujúcim rozlišovaním intolerancie k potravinám:

- pravé, potravinové alergie, spôsobené imunogénmi, ktoré ďalej delíme na tie, ktoré vyvolávajú tvorbu imunoglobulínov triedy E (najmä IgE), ktoré sa u zdravých jedincov nevyskytujú alebo len v stopových množstvách (Rauchová, Rauch, 1997) a tie, ktoré ju nevyvolávajú tzv. „non IgE“ potravinové alergie, ktoré sú sprostredkované neskorým mechanizmom nástupu. Príznaky alergie sa

-
- po požití potravin vyskytnú oneskorene (po niekoľkých hodinách, dňoch) a pravdepodobne majú význam pri chronických problémoch (Drápal et al., 2003).
- nealergická potravinová precitlivosť, neimunologická odpoveď organizmu, spôsobená pravdepodobne len nízkomolekulovými látkami, ktoré sa prirodzene vyskytujú v potravinách (laktóza, histamín), alebo rôznymi potravinovými aditívami (Rauchová, Rauch, 1997).

3.2.1 Výskyt potravinovej alergie

Súčasný údaj naznačuje, že pravá potravinová alergia postihuje 6-8 % dojčiat, 3-5 % malých detí a 2-4 % dospelých osôb (Muraro, 2006) a podľa štúdie Novotnej (2005) dokonca až 8 % dospelých.

V posledných 20 rokoch sa výskyt potravinovej alergie rýchlo zvyšoval. Alergia na orechy, ktorá bola prvýkrát popísaná začiatkom 80. rokov 20. storočia, je dnes veľmi častá, zatiaľ čo incidencia alergie na kravské mlieko sa podľa všetkého stabilizuje. Ako sa menia naše stravovacie návyky, stretávame sa s exotickjšími potravinami a s následným nárastom výskytu a rozširovaním spektra potravinových alergií. Napríklad od prvého popisu alergie na kiwi v roku 1981 došlo k dvadsaťnásobnému zvýšeniu výskytu tohto druhu alergie (Muraro, 2006).

3.2.2 Priebeh potravinovej alergie

Zo štúdie Poulsen (2006) vyplýva, že pravá potravinová alergia sa rozvíja v dvoch fázach:

- prvou je expozícia alergénemu potravinovému proteínu, ktorá vedie k vzniku primárnej alergickej senzibilizácie. Následne dochádza k tvorbe potravinovo špecifických IgE protilátok s výslednou imunologickou pamäťou.
- pri ďalšej expozícii si potravinové alergény vytvoria väzbu s IgE protilátkami naviazanými na tkanivové žirné bunky s následnou degranuláciou. Žirné bunky uvoľňujú mediátory zápalu (ako napr. histamín, tryptázu, chymázu a heparín) a novosyntetizované mediátory zápalu (leukotriény). Táto „skorá fáza“ alergickej reakcie vedie k zvýšenej vazodilatácii a prestupu krvných zložiek cievnou stenou a je sprevádzaná sčervenaním, opuchom a nadmernou tvorbou hlienu. S rozvojom „zápalovej kaskády“ sú eozinofily (biele krvinky) priťahované na miesto alergickej reakcie, kde uvoľňujú vytvorené granulárne mediátory – ECP (Eosinophil Cationic Protein), MBP (Major Basic Protein), atď. – i novovytvorené mediátory zápalu, leukotriény a prozápalové cytokíny. Tieto deje podporujú pretrvávajúci zápal tkaniva

označovaný ako „neskorá fáza“ alergickej reakcie, ku ktorej rozvoju dochádza 2 až 24 hodín po expozícii alergénu. Zdá sa, že perzistujúcimi potravinovými alergiami častejšie trpia jedinci s vysokou IgE reaktivitou („high IgE responders“ – osoby, u ktorých sa vytvárajú vysoké hladiny potravinovo špecifických IgE), kým jedinci s nízkou IgE reaktivitou („low IgE responders“ – jedinci, u ktorých dochádza len k miernemu zvýšeniu hladiny potravinovo špecifických IgE) trpia skôr prechodnými potravinovými alergiami, z ktorých občas s pribúdajúcimi rokmi „vyrastú“.

Ballmer - Weber (2006) ďalej delí potravinové alergické odpovede na odpovede 1. a 2. triedy. Odpovede 1. triedy sú primárne výsledkom gastrointestinálnej senzibilizácie na potraviny prevažne u dojčiat s mohutnejšími počiatočnými alergickými reakciami. Potravinová alergia v mnohých prípadoch odznie už v detstve. Naproti tomu potravinové alergické reakcie 2. triedy sú spúšťané respiračnou senzibilizáciou na bežne vdychované peľové alergény, ktoré skrížene reagujú s potravinovými alergénmi. Tieto reakcie môžu byť menej prudké a obvykle sa objavujú u starších detí a mladších dospelých osôb.

3.2.3 Klinické prejavy alergií

Klinické prejavy potravinovej precitlivenosti môžu byť veľmi pestré. Najčastejšie zahŕňajú príznaky kožné (atopický ekzém, žihľavka, opuch), respiračné (priedušková astma, alergická nádcha a zápal spojiviek), zažívacie problémy (nauzea, zvracanie, hnačka, bolesť brucha) a anafylaktickú reakciu (Drápal et al., 2003).

3.2.3.1 Ekzém, atopická dermatitída

Atopický ekzém (atopická dermatitída) patrí k frekventovaným chronickým kožným ochoreniam detského veku. Je multifaktoriálnym ochorením vznikajúcim kombináciou genetických a imunologických abnormalít a environmentálnych faktorov (Havlíčková et. al., 2008).

Ekzém je najčastejší prejav potravinovej alergie u detí a u detí do jedného roku sa vyskytuje v 80% prípadov (Moláková, 2008).

3.2.3.2 Žihľavka

Žihľavka je reakcia organizmu na vnútorný alebo vonkajší imunitný podnet, čo sa na koži prejaví v podobe výsevov drobných pupencov ružovej farby – tzv. žihľaviek (pupienkov), pretože pripomínajú výsev po popŕhnutí žihľavou. Tento stav často

sprevádza nepríjemné svrbenie kože. Prejavy na koži môžu mať rôzny charakter: od veľkosti pupencov od 5 mm až po gigantické formy (Kročáková, 2007).

3.2.3.3 Astma

Priedušková astma (*asthma bronchiale*) predstavuje chronické zápalové ochorenie dýchacích ciest. Pri astme dochádza k zúženiu (obštrukcii) dýchacích ciest, ktoré sa prejavuje príznakmi ako sťažené dýchanie (typicky s pískaním na hrudníku, najmä pri výdychu), dráždivým kašľom, pocitom dusenia (Hochmut, 2007).

Astma môže vzniknúť po inhalácii potravinového alergénu. Predpokladá sa, že potravinová alergia je príčinou astmy až u 17 – 20% pacientov (Kayserová, 2004).

3.2.3.4 Orálny alergický syndróm

Kayserová (2004) označuje orálny alergický syndróm (OAS) ako prejav lokálnej alergickej reakcie v dutine ústnej po požití ovocia a zeleniny u pacientov s peľovou alergiou.

3.2.3.5 Anafylaktický šok

Anafylaxia je ťažká systémová alergická reakcia spôsobená systémovým uvoľnením histamínu a iných mediátorov, ktoré vyvolávajú mnohé varujúce príznaky – opuch hrtana, stiahnutie dýchacích ciest, pokles tlaku krvi, bolesti brucha, zvracanie a mnohé ďalšie, ktoré nie sú také závažné, ale sú varujúce napr. svrbenie kože, žihľavka, opuch tváre a iné (Michalíčková, 2007).

3.3 Alergia na obilie

Výskyt alergie na obilie sa zvyšuje. Patria sem pšenica, raž, ovos a jačmeň. Závažnosť reakcie môže byť mierna až veľmi vážna a to v súvislosti s fyzickou námahou po jedle. Alergia sa nemusí prejavovať hneď po požití obilia. Najčastejším príznakom alergie na obilie je ekzém, ale môžu to byť taktiež chronické tráviace problémy. Alergici na obilie často konzumujú potraviny, ktoré boli vytvorené pre ľudí s celiakiou. Sú to rôzne cestoviny, chleby a koláče, ale ich cena je zatiaľ dosť vysoká (Bidat, 2005).

Obilniny neobsahujú príliš veľa alergénov. Jeden z alergénov sa nachádza v ryži a spôsobuje alergickú reakciu kože, vykytuje sa najmä v Ázii, alergén sa dá odstrániť

pôsobením uhličitanového pufru pri pH 9, vzniká takto tzv. hypoalergická ryža (Rauchová, Rauch, 1997).

Účinky potravinovej alergie sa objavia ako dôsledok senzibilácie jedinca pôsobením alergénu a následným vytvorením IgE protilátok (Hengel, 2007).

3.3.1 Celiakia

Celiakia je systémová imunologická choroba u geneticky predisponovaných jedincov po požití prolamínov, ktoré sa nachádzajú v pšenici, raži, jačmeni a ovse (Korytárova, Kabátová, 2008). Ovos je v prípade celiakie diskutovanou potravinou, aveníny ovsa neobsahujú alergénne epitopy, ale nie všetci pacienti ovos tolerujú. Predpokladá sa, že výrobky z ovsa sú kvôli agrotechnickým postupom a technologickému spracovaniu takmer vždy kontaminované jačmeňom (Köppel et al., 1998), a teda pre výživu celiatikov nevhodné, výnimku tvoria škandinávské krajiny, kde je ovos povolený na výživu stabilizovaných celiatikov (Socha et al., 2010; Sandberg et al., 2003).

Za bezpečné potraviny na výživu celiakálnych pacientov sa považuje ryža, kukurica a strukoviny. Pšenica je nevhodná, ale prebiehajúce výskumy jej genómu potvrdzujú veľkú rôznorodosť, boli uskutočnené pokusy s rôznymi kultivarmi a výsledky ukázali veľké kvantitatívne rozdiely v prítomnosti toxických peptidov, niektorým kultivarom chýbali úplne. Takýto výskum naznačuje, že prostredníctvom šľachtenia môžeme získať odrody vhodné pre celiatikov (Koning et al., 2005).

Ekvivalentnými pojmami k celiakii sú gluténsenzitívna enteropatia, Gee-Harterov syndróm. Požitie lepku u pacientov trpiacich celiakiou vedie k poškodeniu steny tenkého čreva, toto poškodenie môže viesť k úplnej atrofii črevných klkov. Príznaky, ktoré je možné sledovať u osôb postihnutých celiakiou, zahŕňajú typické prejavy alergie na potravinu, hnačky, bolesti kostí, v niektorých prípadoch chudokrvnosť a kožnú vyrážku (Hulín et al., 2008).

Vzhľadom na to, že účinky vyvolané celiakiou nezahŕňajú imunitný systém (netvorí sa špecifické protilátky IgE) nemôžeme celiakiu považovať za typickú potravinovú alergiu (Schubert-Ullrich et al., 2009).

Lepok je komplex zásobných bielkovín obilného zrna, ktorý po navlhčení vytvára súvislú mriežku, čo je dôležité pre prípravu kysnutého chleba a pečiva (Socha et al., 2010).

Precitlivenosť voči lepku má za následok premnoženie istého druhu bielych krviniek, ktoré poškadzujú stenu tenkého čreva, dochádza ku zmenám sliznice, ktorá je na rozdiel od normálne zvrásnenej patologicky vyhladená, následkom čoho dochádza k nedostatočnému vstrebávaniu živín a v organizme vzniká ich nedostatok (Socha et al., 2010).

Genetická predispozícia k tomuto ochoreniu je dokumentovaná vysokým výskytom HLA DR3/ DQ2, ktorá je u viac ako 90% pacientov a súčasným sklonom k ďalším autoimunitným ochoreniam (Novotná, 2005).

Podľa Koninga et al. (2005) je výskyt celiakie v obyčajnej populácii 0,5 až 1 %, pri jednovaječných dvojčatách sa výskyt zvyšuje až na 10%. Rozvoj celiakie je tiež podmienený životným prostredím a konzumáciou lepku v období po ukončení dojčenia. Riziko ochorenia znižujú malé dávky lepku ešte počas dojčenia, naopak riziko sa zvyšuje podaním veľkých dávok bez predchádzajúcej prípravy. Je taktiež preukázané, že celiakia sa vyskytuje častejšie u žien a detí narodených v letných mesiacoch (Hulín et al., 2008).

Kľúčovú úlohu v patogeneze ochorenia má enzým tkanivová transglutamináza, ktorá vyvoláva intenzívnejšiu produkciu gliadínovo – špecifických T – buniek, ktoré prispievajú k črevnému zápalu a následne k aktivácii B – buniek (T – bunky, B – bunky tvoria tzv. špecifickú bunkovú imunitu). T – bunky celiakálnych pacientov rozpoznávajú tri aminokyselinové sekvencie, resp. peptidy, ktoré sú súčasťou α -gliadínových bielkovín a sú v nich intenzívne zastúpené aminokyseliny prolín a glutamín (Socha et al., 2010).

Výsledky súčasných prieskumov ukazujú, že prevalencia celiakie v jej nemanifestovanej forme je 1:133 v európskej populácii a incidencia v severoamerickej populácii je 1:1000 (Burkhard, 2006).

Je potrebné rozlíšiť celiakiu od potravinovej alergie na pšenicu, pšeničný prach a pod., pre ktoré sú typickými príznakmi kožná reakcia, astma a anafylaktický šok. V tomto prípade sú významne zvýšené hladiny protilátok IgE, čo znamená, že celiakálne epitopy nie sú totožné s epitopmi pri lepkovej alergii (Socha et al., 2010).

3.4 Metódy stanovenia lepkových bielkovín v potravinách

Lepok ako zložka pšeničnej bielkoviny bol objavený pred viac ako 50 rokmi. Lepok je vo vode nerozpustná elastická hmota a získame ho vymývaním z múky (Koning et al., 2005).

Proteíny lepku patria medzi najzložitejšie proteíny vyskytujúce sa v prírode vzhľadom na mnohé rôzne zložky a rôzne veľkosti, k variabilite spôsobenej genotypom, podmienkam pestovania a variabilite technologických procesov. Zohrávajú kľúčovú úlohu pri určovaní reologických vlastností cesta a pri jeho pečení (Wieser, 2007).

Pšeničný lepok má jedinečnú schopnosť, ktorá zabezpečuje vytváranie vysoko súdržného, pružného cesta a bráni úniku bublín plynu vytvorených kvasinkami v procese kvasenia (Janssen, 2006).

Obilné bielkoviny boli rozdelené do štyroch základných typov podľa ich rozpustnosti (Osborne, 1907):

- albumíny – bielkoviny rozpustné vo vode
- globulíny – bielkoviny nerozpustné vo vode, ale rozpustné v zriedených roztokoch solí
- prolamíny – rozpustné v 70 – 85 % alkohole
- glutelíny – rozpustné v zriedených kyselinách a zásadách

Detekcia obsahu prolamínov má významnú úlohu pri výbere potravín pre pacientov postihnutých niektorou z foriem neznášanlivosti lepku, predovšetkým celiatikov a alergikov. Prolamíny pšenice tvoria zhruba 50% lepku – gluténu (Burkhard M., 2006). Pre celiatikov sú toxické prolamíny pšenice (gliadíny), raže (sekalíny), a jačmeňa (hordeíny). Na toxicitu protamínov ovsu (aveníny) neexistuje jednotný názor, prolamíny ryže (oryzíny) a kukurice (zeíny) sú netoxické. Veľmi perspektívnou skupinou plodín pre diétu pri celiakii sú tzv. pseudocereálie, medzi ktoré patrí pohánka, láskavec, quinoa, rosička krvavá alebo majú iba malé percentuálne zastúpenie (Socha et al., 2010). Tieto poznatky potvrdili vo svojej práci aj Palenčárová a Gálová (2010).

Zo zdravotného hľadiska je zaujímavá najmä frakcia s nízkou molekulovou hmotnosťou okolo 20-30 tisíc Da (Palenčárová, Gálová, 2010; Socha et al., 2010).

Koning et al. (2005) vo svojej práci uvádza, že hlavnými komponentami lepku sú glutelíny a gliadín. Gliadín sa delí na α/β , γ a ω – gliadín, moderné metódy ako sú dvoj-rozmerná elektroforéza alebo vysokokvapalinová chromatografia na reverznej fáze

(RP-HPLC) umožňuje oddelenie gliadínu na viac ako 100 komponentov (Wieser, 2007) a glutelín je tvorený glutelínmi nízkomolekulárnej hmotnosti (LMW) a vysokomolekulárnej hmotnosti (HMW).

LMW glutelín možno považovať za všeobecný gliadín, pretože jeho zloženie je porovnateľné s α – gliadínovou frakciou, rozdiel je v tom, že glutelíny sú prítomné v polymérnej forme. Gliadíny a glutelíny sa vyznačujú vysokým obsahom glutamínu (Q) a prolínu (P), avšak chýbajú im nutrične dôležité aminokyseliny – tryptofán, lyzín a metionín, preto je ich výživová hodnota pomerne nízka (Janssen, 2006).

Toxicita gliadínu je široko známa a nie je eliminovaná hydrolýzou týchto bielkovín tráviacimi enzýmami (pepsín, trypsín, pankreatín). Alergénna aktivita glutelínových bielkovín nie je jednoznačná, preukázané su toxické účinky LMW glutelínov, ktoré obsahujú peptidové sekvencie podobné gliadínovým (Hulín et al., 2008).

Označovanie alergénov je dané legislatívou, ale v potravinárskom priemysle sa často stretávame s výskytom tzv. skrytých alergénov. Ich prítomnosť v potravine je založená na skutočnosti, že väčšina prirodzene nealergénnych potravín je nevhodná, pretože veľa rôznych druhov potravín je skladovaných a vyrábaných v rovnakom zariadení. Aj napriek bežnému čisteniu je ťažké zaručiť, že takáto potravina nebola v priebehu výrobného procesu kontaminovaná alergénom (Poms, Anklam, 2004; Hengel, 2007).

Na 28. zasadnutí Codex Commite on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses v roku 2007 bolo navrhnuté, aby sa presnejšie preklasifikovali diétne potraviny vo vzťahu k celiakii. Potraviny boli rozdelené do troch skupín:

- a) potraviny, ktoré neobsahujú žiadne prolamíny z rastlín druhu *Triticum*, jačmeňa, raže a ovsu. Limit pre obsah gluténu je 20 mg.kg^{-1} ,
- b) potraviny, ktorých obsah zložiek z pšenice, jačmeňa, raže, ovsu, a ktoré sú považované za bezlepkové „gluten-free“. Limit pre obsah gluténu je 100 mg.kg^{-1} ,
- c) potraviny, ktoré sú zmesou zložiek uvedených v bodoch a) a b). Limit pre obsah gluténu je 100 mg.kg^{-1} (Socha et al., 2010).

Metódy detekcie lepkových bielkovín môžeme rozdeliť do viacerých skupín a to na základe detekovaného materiálu (Hengel, 2007):

-
1. Imunologické metódy – zahŕňajú zvyčajne imunologické techniky, reakcie antigénu s protilátkou, do tejto skupiny môžeme zaradiť ELISA, Dipstick test, Biosenzor,
 2. Molekulárno-biologické – sú založené na ampifikácii určitého úseku DNA, patria sem PCR, Realtime-PCR.

3.4.1 Všeobecné požiadavky na detečnú metódu

Touto problematikou sa vo svojich štúdiách zaoberali Janssen (2006), Krska et al. (2004), Hengel (2007), Poms a Enklam (2006) a zhrnuli ju do týchto požiadaviek:

1. Dostatočná citlivosť – metóda musí byť schopná detekovať aj stopové množstvá alergénu, potravinu je zložitým súborom jednotlivých zložiek, ktoré môžu komplikovať detekciu alergénu, zložky môžu tlmiť signál. Citlivosť môžeme teoreticky zvýšiť výberom viacerých cieľových analytov. Všeobecná zhoda je, že detekčné limity pre rôzne potravinárske výrobky musia byť niekde medzi 1 a 100 ppm v závislosti od danej potraviny.

2. Uspokojivá špecifita – metóda musí byť schopná rozlíšiť alergénnu zložku od neškodných zložiek potraviny, a tak zabrániť krížovým reakciám a následným chybným výsledkom. Toxicita lepku sa mení v procesoch spracovania, preto by metóda detekcie mala byť schopná zistiť jeho prítomnosť aj v tepelne spracovaných výrobkoch.

3. Rýchle a jednoduché na používanie – musia byť vyhovujúce pre neskúsených pracovníkov v prevádzkach.

Z dôvodu výskytu veľkého počtu odrôd bolo nutné vytvoriť referenčnú vzorku, ktorá by vykazovala dobrú citlivosť s rôznymi protilátkami, dobrú rozpustnosť, homogénnosť, stabilitu a reprezentatívny charakter. Pre tvorbu referenčnej vzorky, ktorá bude vyhovovať všetkým vyššie uvedeným požiadavkám, bolo vybraných 28 kultivarov pšenice a to z troch hlavných producentských krajín Európy – Francúzska, Veľkej Británie a Nemecka. Z každého kultivaru bol vybraný jeden kilogram jadier, ktoré boli následne zmiešané a frézované. Výsledná biela múka bola vákuovo sušená a albumíny a globulíny boli odstránené extrakciou 0,4 M roztoku NaCl a gliadín bol získaný 60% etanolom (Eckert et al., 2006).

3.4.2 Imunoanalytické metódy – ELISA

ELISA je jednou z najpoužívanejších imunologických metód používaných na detekciu protilátok. Táto metóda, tak ako všetky ostatné imunochemické metódy, využíva interakciu antigénu so špecifickými protilátkami za tvorby imunokomplexu antigén-protilátka. Stanovenie tohto komplexu je umožnené naviazaním vhodnej značky, v tomto prípade enzýmu, na jeden z imunoreaktantov (Palenčárová, Gálová, 2010).

Antigén alebo protilátka je imobilizovaná nadviazaním na tuhý nosič, ktorý predstavuje zvyčajne stena skúmavky alebo jamky v mikrotitračnej platni. Enzýmy vhodné pre použitie v tejto metóde musia mať malú relatívnu molekulovú hmotnosť, vysokú stabilitu a enzýmovú aktivitu, vysokoprečistené sa musia dať kovalentne nadviazať na protilátky a rôzne funkčné skupiny antigénov. K najčastejšie používaným enzýmom patria chrenová peroxidáza, alkalická fosfatáza, beta-D-galaktózidáza a glukózaoxidáza (Socha et al., 2010).

Vývoj ELISA bol založený na polyklonálnych aj monoklonálnych protilátkach s rôznymi špecifikami predovšetkým k ω -gliadínom a toxickým sekvenciám. Ideálna ELISA by mala byť schopná stanoviť pšeničné prolamíny s požadovaným detekčným limitom 10 ppm v sušine vzorky a nemala by byť ovplyvnená maticou vzorky (Burkhard, 2006).

Polyklonálne protilátky sú používané najmä ak je nutná väčšia tolerancia k zmenám v povahe alergénu a to najmä, ak v potravine prebehla polymerizácia alebo denaturácia, avšak ich nevýhodou je, že je nutné ich čistenie a častý výskyt krížových reakcií. Na druhej strane výroba monoklonálnych protilátok nie je obmedzená a ich biologická aktivita je stanovená (Asensio et al., 2008)

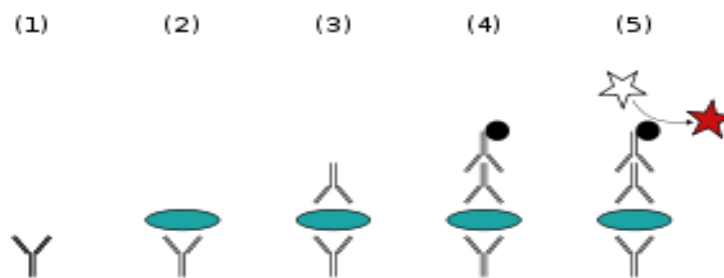
Protilátky sa získavajú imunizáciou cicavcov ako sú myši, králiky, kozy a ovce. Nevýhodou takto získaných protilátok je, že sú získavané z krvi, čo znamená časté krvácanie zvierat alebo dokonca jeho usmrtenie. Nakoľko kurčatá zhromažďujú protilátky vo vajciach a ich imunizácia je zvyčajne lepšia, používajú sa protilátky z vaječného žĺtka, táto metóda získavania protilátok je lacná a prijateľná aj z hľadiska ochrany zvierat (Schubert – Ullrich et al., 2009).

Rozoznávame dva formáty ELISA:

1. Sendvičový ELISA (s-ELISA) – pri tomto formáte je špecifická protilátka imobilizovaná na pevnej fáze (napr. na mikrotitračnej platničke). Po pridaní

skúmanej vzorky je táto naviazaná na imobilizovanú protilátku, následne sa pridá druhá – enzýmovo značená protilátka, ktorá sa viaže na detekovanú bielkovinu (obr. 1). Vznikne farebný produkt, ktorého intenzita zafarbenia je priamo úmerná koncentrácii zisťovaného analytu. Táto metóda je používaná prevažne pre detekciu veľkých molekúl – napr. proteínov (Schubert-Ullrich et al., 2006).

Obr. 1 (Raždíková, 2009) Sendvičová ELISA



Vysvetlivky:

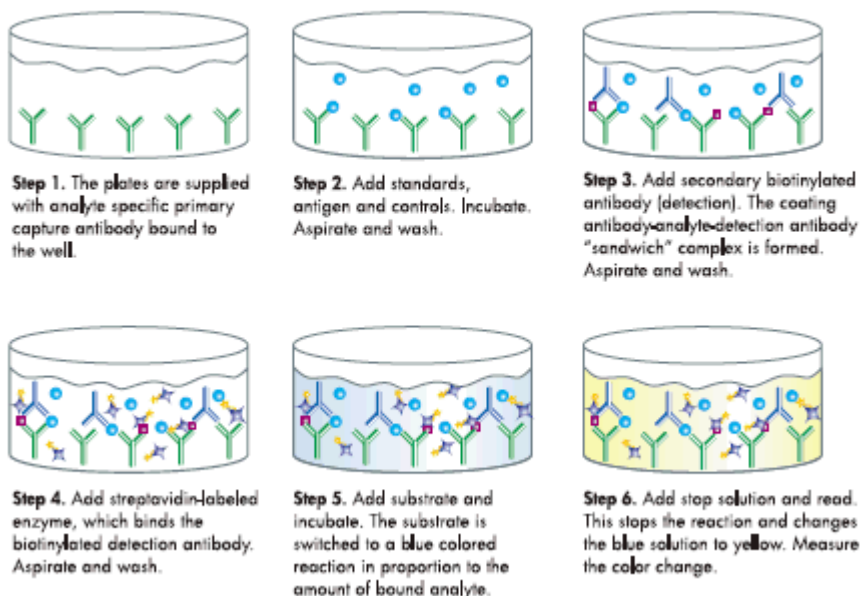
- 1 – v mikrotitračnej platničke je na pevnej fáze imobilizovaná protilátka
- 2 – vzorka = antigén
- 3 – imunokomplex
- 4 – enzým označený sekundárnou protilátkou
- 5 – substrát a vizualizovaný produkt

2. Kompetitívna (konkurenčná) ELISA (c-ELISA) – toto usporiadanie umožňuje detekovať antigény z jedným väzobným miestom pre protilátku, poprípade antigény, ktorých priestorové usporiadanie nedovoľuje vytvorenie sendvičového formátu (Hulín et al., 2008), vizuálne zobrazenie tejto metódy je na obr. 2.

Táto forma usporiadania je výhodná pre detekciu lepku v takých potravinách, v ktorých môžeme očakávať jeho enzymatickú degradáciu napr. v sladovom obilí (Janssen, 2006).

Obr. 2 (URL 1) Kompetitívna ELISA

ELISA Diagram



Step 1: Platničky sú dodávané so špecifickými protilátkami naviazanými na stenu platničky.

Step 2: Pridanie štandardov, antigénov, inkubácia a premývanie.

Step 3: Pridanie sekundárnej protilátky, vytvorí sa komplex protilátka –antigén – sekundárna protilátka.

Step 4: Pridanie streptavidín enzýmovo značený, ktorý sa viaže na protilátku.

Step 5: Pridanie substrátu. Nastane zmena farby (modrá) v pomere k množstvu viazaného analytu.

Step 6: Pridanie stop činidla, ktoré zastaví reakciu a zmenu modrej farby na žltú. Zmeranie zmeny farby.

ELISA je veľmi rýchla na používanie v porovnaní s inými metódami a komerčné testovacie súpravy sú ľahko dostupné, medza detekcie sa pohybuje v rozmedzí od 0,05 do 10 mg.kg⁻¹ (Schubert-Ullrich et al., 2006).

Výhody ELISA (Lacorn, Immer, 2009):

- špecifickosť, presnosť, citlivosť,

Nevýhody ELISA (Olexová et al., 2006):

- nedostatočná citlivosť pri tepelne spracovaných výrobkoch,

Podľa protilátok použitých pri tejto metóde rozlišujeme viacero druhov:

1. ELISA s použitím protilátok proti ω -gliadínu

Tieto monoklonálne protilátky bývajú zvyčajne špecifické voči opakujúcemu sa aminokyselinovému úseku, ktorý je špecifický pre jednu bielkovinovú frakciu, čo môže negatívne vplyvať na presnosť stanovenia z dôvodu rozdielnej kompozície obilniny štandardu a vzorky (Hulín et al., 2008).

ω -gliadíny sa skladajú takmer výhradne z repetitívnych aminokyselinových sekvencií zložených z jednotiek ako PQQQF alebo PQQQFPFQQ (Hulín et al., 2008).

Výhodou tejto metódy je, že všetky frakcie gliadínu sú pomerne dobre extrahovateľné aj po zahriatí na 75 °C, ale pri vyšších teplotách (blížiacich sa 100 °C) zostal extrahovateľný len ω -gliadín, zrejme je to tým, že táto frakcia neobsahuje sulfidické skupiny (Janssen, 2006).

Nevýhodou je nízka citlivosť, ktorej dôvodom je, že ω -gliadín je relatívne malý zlomok. Ďalšou, oveľa závažnejšou nevýhodou je zistenie, že ω -gliadín sa značne líši medzi európskymi odrodami pšenice a to v rozpätí od 6,2 do 20% v závislosti od odrody (Janssen, 2006).

2. ELISA s použitím monoklonálnej protilátke R5

Pri tejto metóde je základom sendvičovej metódy protilátka R5, ktorá bola pripravená imunizáciou myši ražným peptidom. Je špecifická voči sekvenciám QQPFP, QQQFP, LQPFP a QLPFP (Socha et al., 2010).

Komerčné kity na R5 protilátku reagujú krížovo s ovsom, preto nie je vhodná na detekciu kontaminácie ovsa toxickými obilninami (Sandberg et al., 2003).

INGEZIM GLUTEN je metóda založená na dvojzložkovej sendvičovej ELISE, ktorá používa monoklonálnu protilátku R5 ako kľúčové činidlo naviazané na mikrotitračnej platničke aj ako protilátku enzýmovo značenú a to z dôvodu zabezpečenia spoľahlivosti. Táto protilátka je reaktívna prevažne s celiakálne aktívnymi sekvenciami QQPFP, ktoré sú prítomné na gliadíne a tiež so sekvenciami na prolamínoch raže a jačmeňa, nereaguje s prolamínom ovsa (Ranz et al., s.a. – dokončiť citáciu).

Výhodou použitia R5 protilátky je jej schopnosť reagovať s gliadínmi, hordeínmi i sekalínmi aj po ich tepelnom opracovaní, pričom detekčný limit je 1,5 ng/ml (Janssen, 2006). Ďalšími výhodami je lepšia korelácia s celiakálne toxickými

peptidmi, protilátka R5 je najšpecifickejšou pre stanovenie toxických peptidov (Ranz et al., s.a.; Janssen, 2006).

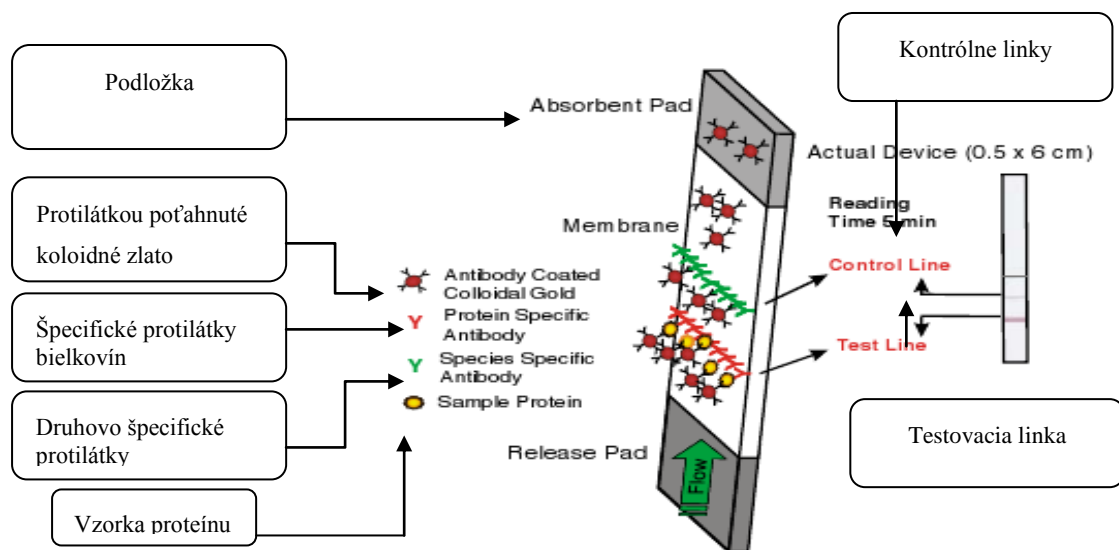
Sendvičová ELISA s protilátkou R5 a enzýmom chrenová peroxidáza je referenčnou metódou v Codex Alimentarius (Socha et al., 2010).

Kanerva et al. (2006) testovali ELISA s protilátkou R5 a ELISA s protilátkou voči ω -gliadínu. Do ovsenej múky pridali známe množstvo jačmenej múky a zistili, že test R5 „nadhodnocuje“ stanovenie, zatiaľ čo test s ω -gliadín-protilátkou „podhodnocuje“.

3.4.3 Imunoanalytické metódy – dipstick a LFA

Zjednodušené ELISA testy, ktoré využívajú pásky (z nylonu, z nitrocelulózy, vinylidénchloridu difluoridu), na ktorých sú naviazané protilátky alebo antigény (obr. 3) (Schubert-Ullrich et al., 2006).

Obr. 3 (Schubert-Ullrich et al., 2006) Princíp dipstick testu



Pri tejto metóde rozlišujeme dva formáty, kompetitívny (konkurenčný) formát, kedy je na nosnej membráne naviazaný antigén a sendvičový formát, kedy je na nosnej membráne naviazaná protilátka (Krska et al., 2004).

Pri sendvičovom usporiadaní je na membráne naviazaná protilátka, detekčné činidlo (tiež zvyčajne protilátka – enzýmovo značená alebo viazaná na latex alebo koloidný kov) je uložené v konjugáte, nie je pevne naviazané. Po pridaní vzorky sa táto začne spolu s konjugátom pohybovať a prechádzať zóny, ak sa nachádza alergén

vo vzorke, imobilizované protilátky v týchto zónach začnú reagovať a vytvoria farebné komplexy (Schubert-Ullrich, 2006).

Testovacie prúžky využívajú podobný mechanizmus len sa nevyužíva pohyblivá fáza, ale protilátka je imobilizovaná na membráne, ktorá sa nachádza na špičke papierika (Schubert-Ullrich, 2006).

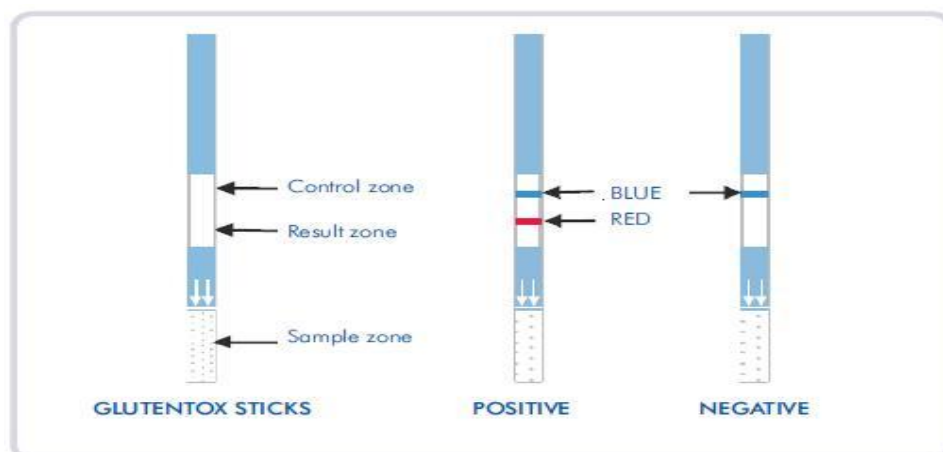
Detekčný limit pre prítomnosť gliadínov v potravinách je 5 až 10 ppm (Poms, Anklam, 2006).

Medza detekcie sa pohybuje medzi 1 až 25 mg alergénu na kg potravy, konkrétne pre lepok je doba detekcie touto metódou 5 až 15 minút, a medza detekcie pod 2,5 mg/kg gliadínu, čo zodpovedá 5mg/kg lepku. Komerčne dostupné umožňujú kvalitatívnu alebo semi-kvantitatívnu detekciu, ale je možná aj kvantifikácia za použitia špeciálnych čítačiek (Schubert-Ullrich, 2006). Vizuálne vyhodnotenie testu pomocou disptick prúžkov je znázornené na obrázku 4.

Výhody (Schubert-Ullrich, 2006; Krska et al.,2004):

- rýchle a ekonomicky efektívne
- nevyžadujú technickú zručnosť

Obr. 4 Vyhodnotenie testu (URL 2)



3.4.4 Imunoanalytické metódy – biosenzory

Biosenzory sú analytické nástroje umožňujúce sledovať biošpecifické interakcie v reálnom čase. Ich princípom je imobilizácia proteínu alebo DNA fragmentu na povrch snímača čipu a následnej reakcie medzi jednou alebo viacerými molekulami, ide o kvantitatívnu metódu (Poms, Anklam, 2004). Imunochemické biosenzory obsahujú

zvyčajne tri zložky: biologický receptor špecifický pre analyt, prevodník pre konverziu do vhodného signálu a snímač signálu (Schubert-Ullrich et al., 2006).

Pri tejto metóde sa v súčasnosti využíva surface plasmon resonancia (SPR), ktorá detekuje väzby medzi molekulami prostredníctvom zmeny v indexe lomu v blízkosti povrchu. Pri tejto metóde je nutná kalibrácia, ktorá sa vykoná nástrekom radu štandardných roztokov so známou koncentráciou alergénu. Každý štandard je spustený presne rovnakým spôsobom ako vzorky neznámej koncentrácie, pričom na konci cyklu prebehne regenerácia povrchu (na regeneráciu sa využíva 0,1 M HCl) (Jonsson et al., 2006).

Výhody tejto metódy (Poms, Anklam, 2004; Jonsson et al., 2006):

- molekuly nemusia byť značené fluorescenčne alebo rádioaktívne ale detekcia i kvantifikácia prebieha na základe merania indexu lomu,
- krátka doba analýzy,
- vysoký stupeň automatizácie

Hlavnou nevýhodou tejto metódy je jej vysoká cena (Lancorn, Immer, 2009).

Haasnoot et al. (2001) vyvinul rýchly SPR test pre detekciu rozpustných bielkovín pšenice, pričom doba trvania testu je len 5 minút, avšak nešlo o detekciu alergénu ale o falšovanie mliečnych výrobkov bielkovinami rastlinného pôvodu.

3.4.5 Ďalšie metódy na zisťovanie lepkových bielkovín v potravinách

3.4.5.1 Elektroforetické metódy

Elektroforéza je jedna z hlavných metódik používaná na analýzu obilných bielkovín. Medzi hlavné metódy môžeme zaradiť elektroforézu v polyakrylamidovom géle s dodecylsulfátom sodným (SDS-PAGE), elektroforézu v kyslom prostredí (acid-PAGE), izoelektrickú fokusáciu (IEF), kapilárnu zónovú elektroforézu (CZE) a vysokoúčinnú dvojrozmernú HPLC-HPCE (Hulín et al., 2008).

Separácia a charakterizácia zásobných bielkovín obilnín prebieha u týchto techník na základe veľkosti alebo ich pohyblivosti v elektrickom poli (Hulín et al., 2008).

Pri separácii bielkovín elektroforetickými metódami sa ako nosiče najčastejšie používajú polyakrylamidové gély, ktorých výhodou je ich nenáročnosť na prípravu, vyznačujú sa dobrými mechanickými vlastnosťami, sú priesvitné, neobsahujú elektricky

nabité skupiny, štruktúra gélu je veľmi dobre reprodukovateľná, má nízku elektroendozmózu a má najlepšiu rozlišovaciu kapacitu (Palenčárová, Gálová, 2010).

Raketová imunoforéza prebieha v gélových vrstvách, ktoré obsahujú monošpecifické precipitujúce protilátky. Molekuly antigénu sa pri nej nepohybujú voľnou difúziou, ale ich pohyb je určený jednosmerným elektrickým polom. Ide o afinitnú elektroforézu, kedy sa zo zmesi rozdeľovaných látok zachytáva len antigén, ktorý môže biošpecifickou väzbou reagovať s protilátkou nachádzajúcou sa v géle. Po zapnutí elektrického napätia molekuly antigénu migrujú do gélu, kde sa stretávajú s molekulami protilátok. Po dosiahnutí ekvivalentného pomeru vznikajú precipitačné útvary podobné raketám. Výška rakiet je priamo úmerná koncentrácii antigénu a môže sa merať priamo alebo po zafarbení (Káš et al., 2006).

HPCE metóda bola využitá na identifikáciu kultivarov pšenice pomocou charakterizácie gliadínu touto metódou (Lookhart, Bean, 1995).

Hydrolyzovaný lepok by mohol byť vhodnou alternatívou k živočíšnej bielkovine v procese ošetrovania vína, ale zvyšné bielkoviny by mohli predstavovať riziko pre ľudí trpiacich celiakiou, preto sa touto problematikou zaoberali Restani et al. (2002). Prítomnosť lepku v ošetrovanom víne bola hodnotená pomocou elektroforetický za prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Z výsledkov ich štúdie vyplýva, že procesy pri výrobe vína znižujú množstvo lepku pod úroveň, ktorá by mohla spôsobovať problémy celiatikom.

3.4.5.2 Chromatografické metódy

Chromatografia (z gréckeho chroma = farba a grafein = písať) je fyzikálno-chemická separačná metóda. Jej podstatou je rozdeľovanie zložiek zmesi medzi dvoma fázami: nepohyblivou (stacionárnou) a pohyblivou (mobilnou), ktoré sa od seba odlišujú niektorou základnou fyzikálno-chemickou vlastnosťou (napr. polaritou). Rozdelenie jednotlivých zložiek zmesi je dôsledkom ich rôznej afinity k týmto dvom fázam (Chovancová, 2006).

Po oddelení sú proteíny detekované pomocou absorpcie UV alebo hmotnostného spektrometra (Lacorn, Immer, 2009).

Chromatografické metódy sú časovo náročné, drahé, menej citlivé a mali by byť vykonávané len expertmi (Lacorn, Immer, 2009).

Na základe analýzy pomocou kvapalinovej chromatografie Mamone et al. (2000) vyvinuli metódu pre rýchlu a citlivú detekciu gliadínov a glutelínov v pšeničnej múke.

3.4.5.3 Hmotnostná spektrometria – MALDI-TOF

Hmotnostná spektrometria je nástrojom pre hodnotenie kvality a bezpečnosti potravín, umožňuje identifikovať, charakterizovať a kvantifikovať biologicky aktívne peptidy. Použitie hmotnostnej spektrometrie v potravinárskych produktoch umožnilo presné určenie molekulovej hmotnosti proteínu a ich sekvencie, detekciu modifikácií po spracovaní potraviny (napr. po fosforylácii), detekovanie nových genetických variantov (Contreras et al., 2008).

Toxické zložky lepku zodpovedné za poškodenie sliznice tenkého čreva (gliadíny, hordeíny, sekalíny) boli analyzované za použitia hmotnostnej spektrometrie, pričom sa zistilo, že hmotnostné profily gliadínu a sekalínu majú takmer charakteristické profily, zatiaľ čo profily hordeínov sa líšia v závislosti od testovaného profilu (Camafeita et al., 1998).

Camafeita et al. (1998) využil túto metódu pre kvantifikáciu gluténu vo vzorkách potravín, pričom medza detekcie bola 0,4 – 10 mg na 100g vzorky.

Analýza HMW glutelínu touto metódou môže slúžiť na identifikáciu kultivarov pšenice tvrdej (Ragnar et al., 1998).

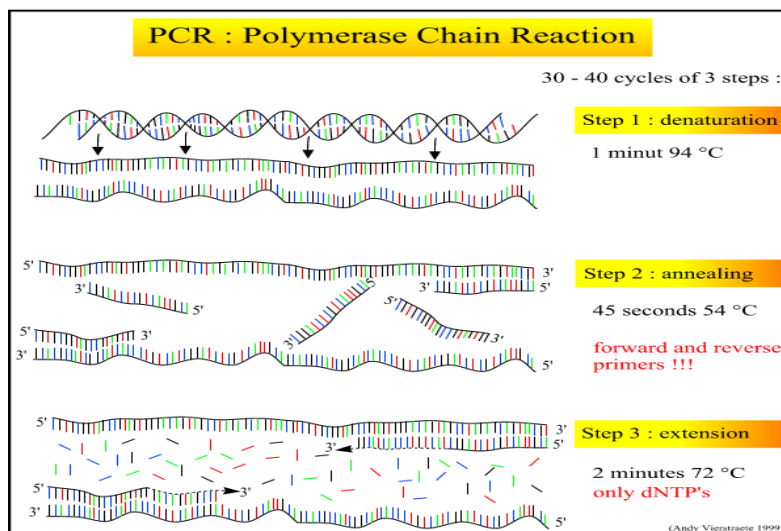
3.4.5.4 Polymerázová reťazová reakcia

Podľa Viglaského et al. PCR (z ang. polymerase chain reaction) je metóda založená na selektívnom zmnožení (amplifikácii) určitého úseku DNA, pričom veľkosť tohto úseku je ohraničená z oboch strán primerami. Pomocou nej je možné zo stopového množstva DNA zisťovanej látky získať stovky ng až jednotky μg DNA (po 20 – 40 cykloch za 2 – 6 hodín) a pozostáva z troch po sebe nasledujúcich krokov (obr 5):

1. Denaturácia – proces pri ktorom dochádza k oddeleniu dvojvláknovej DNA pôsobením teploty okolo $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, čo umožní hybridizáciu primerov.
2. Annealing – naviazanie, nasadenie primerov ku komplementárnej sekvencii denaturovanej DNA, prebieha pri teplote $40\text{ – }72\text{ }^{\circ}\text{C}$ v závislosti od dĺžky a sekvencie primerov.

3. Extenzia (elongácia) – počas tohto kroku DNA polymeráza prikladá k 3'OH koncu primera nukleotidy podľa komplementárnej sekvencie templátu, prebieha pri teplote 72 °C, čo je optimálna teplota pre *Taq* DNA polymerázu.

Obr. 5 (URL3) Princíp PCR



PCR metódy sú založené na inom analyte ako ELISA, nejde priamo o stanovenie lepku v potravinách ale o zistenie prítomnosti DNA rastliny (pšenice, jačmeňa alebo raže). V zásade PCR metódy by mali byť presnejšie ako imunochemické metódy, ale chýba im kvantitatívny potenciál, pretože pomer DNA a lepku sa líši v rôznych druhoch a kultivároch. Avšak táto variabilita nie je väčšia ako jeden poriadok a tak môžeme využívať PCR metódu ako alternatívu k ELISA (Piknová et al., 2008).

Táto metóda je schopná detekovať stopy nepoškodenej DNA a je teda potencionálne vhodnou alternatívou k imunochemickým metódam, vykazuje vyššiu citlivosť ako ELISA, jej nevýhodou je nutné pomnoženie DNA vo vzorke (Hulín et al., 2008). DNA v porovnaní s bielkovinami vykazuje lepšiu stabilitu v priebehu spracovania potravin, preto môže byť uplatnená na detekciu v priebehu celého výrobného postupu. Avšak aj v procese výroby môže nastať situácia, kedy sa DNA v potravinách nachádza, ale bielkoviny boli počas spracovania odstránené, vtedy môžeme pomocou PCR zistiť skresľujúce výsledky (Poms, Anklam, 2004). Odchýlky od pomeru medzi signálom PCR a ELISA sú orientačné a môžu nastať dve situácie, pri oboch musí prebehnúť ďalšie vyšetrovanie (Janssen, 2006):

1. Po pridaní pšeničného škrobu – PCR pozitívna, ELISA negatívna.
2. Pridanie lepku do potravin – PCR nízka alebo negatívna a ELISA vysoko pozitívna.

Výhody PCR (Poms, Anklam, 2004; Janssen, 2006):

- špecifickosť a stabilita v procese spracovania,
- metóda vhodná pre stanovenie lepku v tepelne spracovaných výrobkoch,

Nevýhody PCR (Poms, Anklam, 2004; Janssen, 2006):

- kvalitatívna metóda (pozn. RT-PCR kvantitatívna),
- nestabilný pomer DNA a bielkoviny,
- ťažšia extrakcia DNA ak boli do potraviny pridané emulgátory alebo zahusťovadlá.

Prvá PCR analýza na zistenie prítomnosti pšenice v gluten-free produktoch bola uskutočnená Allmänom et al. (1993). Test pozostával z dvojice PCR: PCR zosilňujúca fragment 137 bp, ktorý je veľmi stály a slúžil ako kontrola a PCR zosilňujúca fragment 109 bp špecifický pre pšenicu, tento bol zvolený, pretože sa nachádza vo vysokom počte kópií, čo umožňuje citlivú detekciu. Analýza bola špecifická pre pšenicu, raž vyrábala veľmi slabý signál. Citlivosť analýzy bola 1 pg pšeničnej DNA, čo zodpovedá 50 ng pšenice (Janssen, 2006).

V štúdií Köppela et al. (1998) bolo vyšetovaných 38 vzoriek výrobkov z ovsu pomocou ELISA a PCR. 30 vzoriek pozostávalo z rôznych druhov vločiek a 8 z priemyslene spracovanej stravy. Detekciou gliadínu pomocou ELISA sa zistilo, že 16 vzoriek obsahuje menej ako 0,2 mg gliadínu/100 g sušiny, 21 vzoriek menej ako 2,8 mg gliadínu/100 g sušiny a 1 vzorka 38 mg gliadínu/100 g sušiny, čo presahuje limit povolený pre Švajčiarsko (limit 10 mg/100 g sušiny). Paralelne prebiehajúca PCR vykázala desaťkrát vyššiu citlivosť ako ELISA za predpokladu, že je DNA plne namnožená (amplifikovaná). Detekčný limit pre obsah pšenice sa opakovane zistil v rozmedzí 0,001 až 0,01%, čo zodpovedá $0,04 \pm 0,4$ mg gliadínu na 100 g ovsu, detekčný limit pre ELISA v tomto pokuse bol asi 10 krát menej citlivý.

PCR využila vo svojej práci Olexová et al. (2004), ktorá pomocou tejto metódy určovala kontamináciu bezpečnostných potravín obilninami nevhodnými pre citlivých konzumentov. Detekčný limit určený touto prácou bol 10mg lepku na 100g potraviny.

Real-time PCR (RT-PCR)

Real-time PCR umožňuje detekciu alergénu bez použitia gélu, ktorý sa nahradí špecifickou cieľovou sondou a použitím farbiva. Počas reakcie prichádza ku štiepeniu DNA a oddeleniu farbiva. Výsledný nárast fluorescence je úmerný špecifickým PCR

produktom. Poradie cyklu, v ktorom úroveň fluorescence prekročí referenčnú dávku farbiva sa používa na kvantitatívny výpočet (Poms, Anklam, 2004).

Realtime PCR v spojení s farbivom SYBRgreen bola použitá na identifikáciu finálnych potravinárskych výrobkov z pšenice, raže, jačmeňa a pre detekciu kontaminácie ovsa. Boli vybrané špecifické primery prolamínov obilnín, ich dĺžka sa pohybovala medzi 104 a 181 bázových párov a bod topenia medzi 81,2 a 85 °C. Ideálna dĺžka amlifikovaných báz by nemala presiahnuť 200 párov, pretože DNA v pečených výrobkoch môže byť degradovaná a tým by vznikol jej nedostatok na jej zmnoženie. Výsledky analýzy boli porovnané s ELISA s použitím monoklonálnych protilátok na ω -gliadín a vykazovali dobrú koreláciu. Výhody Realtime-PCR spočívajú v použití uzatvoreného systému, ktorý sa tiež používa na zmnoženie a tým sa znižuje riziko kontaminácie medzi vzorkami (Sandberg et al., 2003).

V posledných rokoch sa začala prednostne používať Realtime-PCR značená Taqman sondou. Túto metódu využila vo svojej práci Piknová et al. (2008), ktorá izolovala DNA pomocou nukleázy kódujúcej puroindoline b. Detekčný limit bol 0,026 ng pšenice DNA.

Výhody Realtime-PCR (Sandberg et al., 2003; Poms, Anklam, 2004; Piknová et al., 2008; Zeltner et al., 2009):

- je špecifickosť, citlivosť a predchádzanie kontaminácie, nakoľko celý proces detekcie prebieha v uzatvorenej trubici,
- extrémna presnosť,
- relatívne vysoká stabilita voči životnému prostrediu,
- menej pracná metóda – nie je nutné odlievať agarózový gél.

Nevýhody Realtime-PCR (Poms, Anklam, 2004; Zeltner et al., 2009):

- drahšie zariadenie na jej výkon,
- poškodenie DNA alebo enzymatické spracovanie potravy môže viesť k falošne negatívnym výsledkom,
- DNA je citlivá na nízke pH a strižné sily použité v niektorých prípadoch pri výrobe potravy.

Realtime-PCR bola využitá pri zisťovaní genetickej modifikácie pšenice obyčajnej (Vauturin et al., 2007) a pre detekciu pšenice obyčajnej, ktorá je pridávaná do cestovín vyrobených z pšenice tvrdej – falšovanie (Alary et al., 2002).

Størsrud (2003) vo svojej štúdií dokázal touto metódou, že ovos je nevhodný na konzum pre celiakov a to z dôvodu častej kontaminácie pšenicom, jačmeňom alebo ražou a to v takej miere, ktorá by mohla ohroziť zdravie pacienta.

Realtime-PCR je rýchla jednoducho ovládateľná, preto v sebe má potenciál stať sa veľmi dôležitým nástrojom pri detekcii alergénov.

Metódu Realtime-PCR v spojení s Taqman® sondou Zeltner et al. (2009) na detekciu cereálií obsahujúcich glutén, pričom pre detekciu pšenice, kamutu, špaldy a raže boli zvolené sekvencie kódujúce HMW glutelín a pre zisťovanie raže bol vybraný gén Hor3. Prítomnosť týchto sekvencií sa zisťovala v mäsových výrobkoch a detekčný limit bol stanovený pri pšenici na 5mg/kg a pri jačmeni 10mg/kg.

ELISA-PCR

PCR-ELISA metóda kombinuje vysoko špecifickú PCR a ekonomicky výhodnú ELISA na semi-kvantitatívnu analýzu. V procese analýzy prebehne zosílenie DNA fragmentu, následne je produkt viazaný na povrch mikrotitračnej platne, DNA fragment je označený proteínom, ktorý ak sa vyskytuje, je detekovaný pomocou ELISA (Poms, Anklam, 2004).

4 Návrh na využitie poznatkov

Na detekciu lepkových bielkovín v podmienkach slovenského trhu je najvhodnejšia ELISA, nakoľko sú dostupné kity, ktoré:

- umožňujú detekovať viac vzorkov v jednom,
- všetky potrebné reagensy sa nachádzajú v súprave,
- umožňujú rýchlu a ľahkú extrakciu vzorkov,
- celková doba detekcie nepresahuje 3,5 hodiny,
- sú dostatočne citlivé – 5 ng/ml prolamínov pšenice,
- sú špecifické – pšenica (100%), raž (90-100%), jačmeň (5-10%), kukurica (0%).

Alternatívou vhodnou pre použitie na slovenskom trhu je PCR, nakoľko:

- je schopná detekovať stopy nepoškodenej DNA,
- vykazuje vyššiu citlivosť ako ELISA,
- DNA vykazuje lepšiu stabilitu v procese tepelného spracovania – detekcia v tepelne spracovaných výrobkoch.

Záver

Problémy vyskytujúce sa pri detekcii lepkových bielkovín v potravinách spočívajú predovšetkým v nejednoznačne definovanom analyte. V súčasnosti sa veľa výskumov zaoberá detekciou tzv. toxických sekvencií a skúmaním kultivarov pšenice, ktoré prirodzene neobsahujú tieto sekvencie alebo ich obsahujú v menšej miere. Prvé štúdie zamerané na detekciu a stanovenie pšeničného lepku stanovovalo prevažne druhy obilnín bez toho, aby brali do úvahy ich toxicitu. Ďalšími problémami vyskytujúcimi sa pri detekcii lepku sú heterogenita analytu, ktorá sa môže zvyšovať pokiaľ v priebehu výroby dochádza ku zmenám bielkovín (napr. tepelná denaturácia, enzymatické štiepenie), ročník pestovania obilniny, oblasť, v ktorej sa pestuje a odroda obilniny. Problémom pri detekcii je tiež stanovenie detekčného limitu, nakoľko pacienti trpiaci celiakiou reagujú vo väčšine prípadov idividuálne.

Pre analýzu lepkových bielkovín bolo využité veľké množstvo metód, ktoré boli založené na rôznych princípoch – elektroforéza, chromatografia, detekcia DNA a imunochemické stanovenie. V súčasnosti sa vo veľkej miere využíva predovšetkým ELISA. Bol vyvinutý veľký počet ELISA, ktoré vykazovali rôznu citlivosť a špecifitu. Účinnosť metódy ELISA je primárne závislá na kvalite protilátky, teda jej reaktívnosti s antigénom detekovaných bielkovín. Protilátky proti toxickým sekvenciám gliadínu sa v súčasnosti považujú za najvhodnejšie pre stanovenie jačmeňa, ale ich nevýhodou je možný výskyt krížových reakcií s bielkovinami raže a problematická detekcia lepku v tepelne opracovaných potravinách

Alternatíva k ELISA testom je polymerázová reťazová reakcia, ktorej detekčný limit je menší ako 10 ppm. DNA analýza sa pohybuje medzi 2 – 6 hodinami, pričom väčšina času je potrebná pre extrakciu DNA. Táto metóda je do značnej miery závislá na potravinovej matrici, ktorá sa testuje.

Ďalší vývoj sa očakáva aj v oblasti rýchlych skriningových testov, ktoré sa budú dať použiť priamo v procese výroby potravín na zistenie konatminácie, pri overovaní plnenia HACCP plánu či sú kritické kontrolné body plne pod kontrolou. V súčasnej dobe sú už na trhu dostupné rýchle ELISA testy (skúšobná doba 30 -35 min.) a testy LFA a dipstick, pri ktorých je doba stanovenia menej ako 10 min.

V rámci projektu Quantification of Coeliac Disease toxic gluten in foodstuffs using a Chip system with integrated Extraction, Fluidics and biosensoric detection je vyvíjaný biočip, ktorý využíva nanotechnológiu. Metóda je založená na protilátkach proti toxickým bielkovinám alebo na syntetických DNA alebo RNA konštrukciách, ktoré preukazujú vysokú afinitu k toxickým bielkovinám. Čas potrebný pre celkovú skúšku musí byť menší ako 15 minút a cena nižšia ako 15 eur. Tento projekt je avšak v prípravnom období a k dispozícii nie sú žiadne výsledky.

Zoznam použitej literatúry

ALARY, R. – SERIN, A. – DUVIAU, M. P. – JOUDRIER, P. – GAUTIER, M. F. Quantification of common wheat adulteration of durum wheat pasta using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). In *Cereal Chemistry*, č. 79, 2002, s. 553–558.

ALLMÄN, M. - CANDRIAN, U. - HOFELEIN, C. - LÜTHY, J. Polymerase chain reaction (PCR): A possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. In *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, č. 196, 1993, s. 248–251.

ALLMER – WEBER, B. - POULSEN, L. 2006. Ako vlastne prebieha potravinová alergická reakcia. In MORRIS, A. J. a i. 2006. *Potravinové alergie. Závery vzdelávacieho cyklu EAACI / GA2LEN* [online]. Dánsko : s. n., 2006 [cit. 2009-04-20], s. 7-10. Dostupné na internete: <<http://www.alergia.sk/files/potravinove%20alergie.pdf>>.

ASENSIO, L. – GONZÁLEZ, I. – GARCÍA, T. – MARTÍN, R. 2008. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In *Food control*, roč. 19, 2008, č. 1, s. 1-8.

BALLMER – WEBER, B. Ako vlastne prebieha potravinová alergická reakcia? In MORRIS, A. J. et al. 2006. *Potravinové alergie. Závery vzdelávacieho cyklu EAACI / GA2LEN* [online]. Dánsko : s. n., 2006 [cit. 2009-04-02], s. 6. Dostupné na internete: <<http://www.alergia.sk/files/potravinove%20alergie.pdf>>.

BIDAT, É. - LOIGEROT, CH. 2005. *Alergie u dětí*. 1. vyd. Praha : Portál, s. r. o., 2005. 148 s. ISBN 80-7178-936-4.

BURKHARD, M. 2006. Imunochemické vlastnosti prolaminů a jejich analytické využití [online] [cit. 2009-04-20]. Dostupné na internete: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/studium/absolventi/burkhard.pdf>>.

CAMAFEITA, E. – ALFONSO, P. – MOTHESE, T. – MÉNDEZ, E. 1998. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: the first non-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples. In *Journal of Mass Spectrometry*, roč. 32, č. 9, s. 940-947.

CONTRERAS, M. – LOPEZ-EXPOSITO, I. – HERNANDEZ-LEDESMA, B. – RAMOS, M. – RECIO, I. 2008. Application of mass spectrometry to the

characterization and quantification of food-derived bioactive peptides (special guest editor section) (Report). In *Journal of AOAC International* [online]. 2008 [cit. 2010-03-31] Dostupné na internete: <<http://www.highbeam.com/doc/1G1-183367447.html>>.

DRÁPAL, J. – ETTLEROVÁ, K. – HAJŠLOVÁ, J. – HLÚBIK, P. – JECHOVÁ, M. – KOZÁKOVÁ, M. – MALÍŘ, F. – OSTRÝ, V. – RUPRICH, J. – SOSNOVCOVÁ, J. – ŠPELINA, V. – WINKLEROVÁ, D. *Potravinová přecitlivělost: alergie a intolerance : deklasifikovaný dokument*. Brno : VVP, 2003, 38 s.

ECKERT, R. et al. 2006. Towards a new gliadin reference material— isolation and characterisation. In *Journal of Cereal Science*, 2006, roč. 43, č. 3, s. 331-341.

HAASNOOT, W – OLIEMAN, K. – CAZEMIER, G. – VERHEIJEN, R. 2001. Direct Biosensor Immunoassays for the Detection on Nonmilk Proteins in Milk Powder. In *Food Chem.*, roč. 11, 2001, č. 49, s. 5201 – 5206.

HAVLÍČEKOVÁ, Z. - JESEŇÁK, M. - JAKUŠOVÁ, L. - SZÉPEOVÁ, R. - BÁNOVIČ, P. 2008. Diéta v liečbe atopického ekzému v detskom veku. In *Dermatologie pro praxi*, roč. 4, 2008, č. 2, s. 181.

HENGEL, A. 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. In *Anal. Bionanal. Chem.*, roč. 389, s. 111 – 118.

HULÍN, P. - DOSTÁLEK, P. - HOCHEL, I. 2008. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. In *Chemické listy 102* [online]. 2008, [cit. 2009-04-20], s. 327-337. Dostupné na internete: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_05_327-337.pdf.

HOCHMUT, L. 2007. Sezónna astma. In *Alergia, astma a my*, roč. 2007, 2007, č. 3, s. 7.

CHOVANCOVÁ, M. 2006. Plynová chromatografia [online] [cit. 2009-04-20]. Dostupné na internete: <<http://naturalsession.wz.cz/chemia/anal/plynovachromatografia.pdf>>.

JANSSEN, F. 2006. Detecting wheat gluten in food. In *Detecting Allergens in Food*. b. m. : b. v., 2006, s. 244-272. ISBN 978-0-8493-2574-8.

JAVORSKÝ, P. 2003. Amplifikačné metódy [online] [cit. 2010-3-21]. Dostupné na internete: <<http://www2.saske.sk/javorsky/pdf/Prednasky/P3-PCR.pdf>>.

-
- JONSSON, J. – ERIKSSON, A. – YMAN, I. 2006. Detecting food allergens with a surface plasmon resonance immunoassay. In *Detecting Allergens in Food*. b. m. : b. v., 2006, s. 158-174.
- KANERVA, P.M. – SONTAG-STORM, T.S. – RYOPPY, P.H. 2006. Analysis of barley contamination in oats using R5 and α -gliadin antibodies. In *European Food Research and Technology*, roč. 44, 2006, č. 3, s. 347-352.
- KÁŠ, J. – KODÍČEK, M. – VALENTOVÁ, O. 2006. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko.technologická, 2006. s. 227. ISBN 80-7080-586-2.
- KAYSEROVÁ, H. 2004. Potravinová alergie. In *VIA PRACTICA* [online]. 2004, č. 2 [cit. 2009-04-20], s. 90-94. Dostupné na internete: <http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/Via_02_04.pdf>.
- KAYSEROVÁ, H. 2007. Potravinová alergie. In *Alergia, astma a my*, roč. 2007, 2007, č. 3, s. 18-21.
- KONING, F. – GILISSEN, L. – WIJMENGA, C. 2005. Gluten: a two-edged sword. Immunopathogenesis of celiac disease. In *Springer Semin Immun*, 2005, roč. 27, č. 5, s. 217-232.
- KORYTÁROVÁ, J. – KABÁTOVÁ, J. 2008. Súčasný pohľad imunoalergológa a gastroenterológa na celiakiu. In *Alergie, Supplementum*, 2008, roč. 2008, č. 2, s. 100.
- KÖPPEL, E. – STADLER, M. – LÜTHY, J. – HÜBNER, P. 1998. Detection of wheat contamination in oats by polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In *Z Lebensm Unters Forsch A*, 1998, roč. 206, s. 399 – 403.
- KROČÁKOVÁ, J. 2007. Urtikária – žihľavka. In *Alergia, astma a my*, roč. 2007, 2007, č. 3, s. 30.
- KRSKA, R. – WELZIG, E. – BAUMGARTNER, S. 2004. Immunoanalytical detection of allergenic proteins in food. In *Anal Bioanal Chem*, 2004, roč. 378, č. 1, s. 63-65.
- LACORN, M. – IMMER, U. 2009. Standardization in allergen determination. In *Accred Qual Assur*, roč. 15, č. 4, s. 207-216.
- LOOKHART, G. – BEAN, S. 1995. Separation and Characterization of Wheat Protein Fractions by High-Performance Capillary Electrophoresis. In *Cereal Chemistry*, 2006, roč. 72, č. 6, s. 527-532.
-

-
- MAMONE, G. – FERRANTI, P. – CHIANESE, L. – SCAFURI, L. – ADDEO, F. 2000. Qualitative and quantitative analysis of wheat gluten proteins by liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. In *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000, roč. 14, č. 10, s. 897-904.
- MOLÁKOVÁ, H. *Potravinové alergie : bakalárska práca*. Brno : Masarykova univerzita, 2008. 42 s.
- MICHALIČKOVÁ, J. 2007. Pohotovostný balíček – kto ho má nosiť? In *Alergia, astma a my*, roč. 2007, 2007, č. 3, s. 16.
- MURARO, Antonella. 2006. Výskyt potravinovej alergie. In MORRIS, A. J. a i. 2006. *Potravinové alergie. Závery vzdelávacieho cyklu EAACI / GA2LEN* [online]. Dánsko : s. n., 2006 [cit. 2009-04-20], s. 6. Dostupné na internete: <<http://www.alergia.sk/files/potravinove%20alergie.pdf>>.
- NOVOTNÁ, B. 2005. Alergie zažívacieho traktu. In *Interní medicína pro praxi*, 2005, č. 11, s. 492-495.
- OLEXOVÁ, L. – DOVIČOVIČOVÁ, L. – ŠVEC, M. – SIEKEL, P. – KUČHTA, T. 2006. Detection of gluten-containing cereals in flours and „gluten-free“ bakery products by polymerase chain reaction. In *Food Control*, 2006, roč. 17, č. 3, s. 234-237.
- OSBORNE, T. B. 1907. The proteins of the wheat kernel. Carnegie Inst.:Washington, DC., č. 84, s. 1-119.
- PALENČÁROVÁ, E. – GÁLOVÁ, Z. 2010. Detekcia celiakálne aktívnych bielkovín elektroforetickou a imunochemickou metódou. In *Potravinárstvo*, 2010, roč. 4, mimoriadne číslo, s. 485-490.
- PIKNOVÁ, Ľ. – BREŽNÁ, B. – KUČHTA, T. 2008. Detection of gluten-containing cereals in food by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction. In *Journal on food and Nutrition Research*, roč. 3, 2008, č. 47, s. 114-119.
- POMS, R. – ANKLAM, E. 2004. Polymerase Chain Reaction Techniques for Food Allergen Detection. In *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, roč. 6, 2004, č. 87, s. 1391-1397.
- POULSEN, L. 2006. Ako vlastne prebieha potravinová alergická reakcia? In MORRIS, A. J. et al. 2006. *Potravinové alergie. Závery vzdelávacieho cyklu EAACI / GA2LEN* [online]. Dánsko : s. n., 2006 [cit. 2009-04-02], s. 6. Dostupné na internete: <<http://www.alergia.sk/files/potravinove%20alergie.pdf>>.
-

RAGNAR et al. 1998. Analysis of wheat gluten proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. In *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 1998, roč. 5, č. 33, s. 429-435 [cit. 2010-03-31]. Dostupné na inernete: <<http://www3.interscience.wiley.com/journal/6116/abstract>>.

RANZ, I. – VENTEO, A. – VELA, C. – SANZ, A. s. a. Ingezim gluten. Immunoenzymatic assay for gluten detection using monoclonal antibody R5. s. a., [online] [cit. 2009-04-20]. Dostupné na internete: <<http://www.biognosisltd.co.uk/Products/Gluten/proceeding%20of%20INGENASA%2018th%20PWG%20meeting.pdf>>.

RAUCHOVÁ, H. – RAUCH, P. 1997. Alergeny potravín. In *Chemické listy 91* [online]. 1997, [cit. 2009-04-20], s. 189-193. Dostupné na internete: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_03_189-193.pdf>.

RAŽDÍKOVÁ, A. *Analýza celiakálne aktívnych bielkovín metódou ELISA : bakalárska práca*. Nitra : SPU, 2009.

RESTANI, P. – BERETTA, P. – BALLABIO, C. – GALLI, C. L. – BERTELLI, A. A. 2002. Evaluation by SDS-Page and immunoblotting of residual antigenicity in gluten-treated wine: a preliminary study. In *Int J Tissue React.*[online]. 2002, roč. 24, č. 2 [cit. 2010-3-31]. Dostupné na internete: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12182232>>.

SANDBERG, M. – LUNDBERG, L. – FERM, M. – YMAN, I. 2003. Real Time PCR for the detection and discrimination of cereal contamination in gluten free foods. In *Eur Food Res Technol*, roč. 2003, 2003, č. 217, s. 344-349.

SCHUBERT-ULLRICH, P. – RUDOLF, J. – ANSARI, P. – GALLER, P. – FÜHRER, M. – MOLINELLI, A. – BAUMGARTNER, S. 2009. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. In *Anal Bioanal Chem*, 2009, roč. 395, č. 1, s. 69-81.

PODHRADSKÝ, D. – PAULÍKOVÁ, H. – DANKO, P. – SEDLÁK, E. 2007. Praktikum z biochémie. 2. Vydanie. Košice : UPJŠ. 2007. s. 126.

SOCHA, P. – RAŽDÍKOVÁ, A. – URMINSKÁ, D. 2010. Optimalizácia stanovenia prítomnosti celiakálne aktívnych bielkovín v cereáliách a pseudocereáliách. In *Potravinárstvo*, 2010, roč. 4, mimoriadne číslo, s. 497-508.

SMERNICA EURÓPSKEHO PRALAMENTU A RADY 2000/13/ES z 20. marca 2000 o aproximácii zákonov členských štátov týkajúcich sa označovania, prezentácie a propagácie potravín.

SMERNICA EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY 2003/89/ES z 10. novembra 2003, ktorou sa mení a dopĺňa smernica 2000/13/ES o označovaní zložiek prítomných v potravinách.

SMERNICA KOMISE 2007/68/ES z 27. novembra 2007, ktorým sa mení príloha IIIa smernice Európskeho parlamentu a Rady 2000/13/ES, pokiaľ ide o určité zložky potravín.

STØRSRUD, S. – YMAN-MAHMED, I. – LENNER, R.A. 2003. Gluten contamination in oat products and products naturally free from gluten. In *Eur Food Res Technol*, 2003, roč. 217, č. 6, s. 481-485.

URL1: Elisa diagram 2008 [online] [cit. 2010-4-7]. Dostupné na inernete: <<http://www.komabiotech.co.kr/www/techniques/immunodection/images/elisaDiagram.gif>>.

URL2: GlutenTox Sticks for Gluten Testing in Food or Environment [s.a.] [online] [cit. 2010-4-10]. Dostupné na inernete: <<http://www.arrowscientific.com.au/images/products/Gluten%20test%20sticks%20interpretation.JPG>>.

URL3: Principle of the PCR 1999 [online] [cit. 2010-4-7] Dostupné na inernete: <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif>>.

ÚRADNÝ VESTNÍK L 308 z 25. novembra 2003, roč. 46. ISSN 1725-2555.

VAUTURIN, S. – ZHANG, D. 2007. Real-time polymerase chain reaction assay for endogenous reference gene for specific detection and quantification of common wheat-derived DNA (*Triticum aestivum* L.). In *Journal of AOAC International*, 2007, roč. 90, č. 3, s. 794–801.

VIGLASKÝ, V. – ČIKOŠ, Š. – PRISTAŠ, P. – JAVORSKÝ, P. 2000. *Praktikum z biochémie nukleových kyselín*. Košice : UPJŠ, s. 17-32.

VRBOVÁ, B. *Analýza obrazů z gélové elektroforézy : bakalárska práca*. Praha : České vysoké učení technické, 2006. 47 s.

Výnos Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky a Ministerstva zdravotníctva Sloveneskej republiky z 28. apríla 2004 č. 1187/2004 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín.

WIESER, H. 2007. Chemistry of gluten proteins. In *Food Microbiology*, 2009, roč. 2, č. 24, s. 115-119.

ZELTNER, D. – GLOMB, M. – MAEDE, D. 2009. Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. In *European Food Research and Technology A*, 2009, roč. 228, č. 3, s. 321-330.

ZUBERBIER, T. – REE, R. 2006. Ktoré potraviny sú problémové. In MORRIS, A. J. a i. 2006. *Potravinové alergie. Závery vzdelávacieho cyklu EAACI / GA2LEN* [online]. Dánsko : s. n., 2006 [cit. 2009-04-20], s. 11-12. Dostupné na internete: <<http://www.alergia.sk/files/potravinove%20alergie.pdf>>.