

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA  
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

1126063

**SPÔSOBY DETEKCIE RÝB AKO ALERGÉNEJ ZLOŽKY  
V POTRAVINÁCH**

**2010**

**Anna Jakubovičová**

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA  
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**SPÔSOBY DETEKČIE RÝB AKO ALERGÉNEJ ZLOŽKY  
V POTRAVINÁCH**

**Bakalárska práca**

Študijný program:	Bezpečnosť a kontrola potravín
Študijný odbor:	6. 1. 13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov
Školiace pracovisko:	Katedra hygiena a bezpečnosti potravín
Školiteľ:	Ing. Radoslav Židek, PhD

**Nitra, 2010**

**Anna Jakubovičová**

### Čestné vyhlásenie

Podpísaná Anna Jakubovičová vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Spôsoby detekcie rýb ako alergénnej zložky v potravinách“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

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

V Nitre 23. apríla 2010

Anna Jakubovičová

## Podakovanie

Týmto chcem poďakovať môjmu vedúcemu práce Ing. Radoslavovi Židekovi, PhD za cenné rady a pripomienky pri vypracovávaní mojej práce.

## **Abstrakt**

Cieľom tejto práce bolo nájsť a zhromaždiť informácie o možnostiach detekcie rybacích alergénov v potravinách v súčasnosti. Alergény, ktoré nie sú označené na etiketách potravín, a sú teda skryté, sú potenciálnym rizikom pre spotrebiteľov a môžu spôsobiť aj anafylaktický šok. Označovanie alergénov na etiketách vyžaduje aj legislatíva. Táto práca zahŕňa všeobecné pojmy o alergénoch, charakterizuje rybacie alergény, ich nebezpečenstvá a možnosti ich identifikácie v potravinách pomocou prístrojových techník. Snažili sme sa vyhľadať metódy, ktoré boli skúmané a použité na zisťovanie rybacích alergénov. Hlavným alergénom rýb je parvalbumín, toxický je aj histamín a v mojej práci som aj opísala Ani s 1, ktorý je hlavný alergén parazita *Anisakis simplex*, ktorému sa venuje v poslednej dobe veľká pozornosť. Zistili sme, že detekcia rybacích alergénov v potravinách je náročná, nakoľko existuje mnoho druhov rýb, ktoré obsahujú špecifické alergény. Zamerali sme sa predovšetkým na alergény morských rýb, ktorým sa venuje väčšia pozornosť hlavne v zahraničí. Metód nie je mnoho, avšak stále sa im venuje čoraz väčšia pozornosť a vyvíjajú sa nové technológie a možnosti.

**Kľúčové slová:** alergén, detekcia, rybí alergén

## **Abstrakt**

An aim of this study was to find and gather an informations about a possibilities of fish detection allergens in foods today. The allergens that are not marked on food labels and they are thus hidden, it is a potential risk for consumers and they can also cause An anaphylactic shock. The labeling of allergens on labels required by the legislation. The work includes general terms for allergens, fish allergens are characterized and their dangers too and possibilities of their identification in foods by instrumental techniques are characterized here. We tried to find methods which have been studied and used for the detection of fish allergens. The main allergen of fish is a parvalbumin and histamine is also toxic. In my work I have described, neither one of which is the major allergen parasite An Anisakis simplex, which is devoted in last years much attention. We found that the detection of fish allergens in food is difficult because there are a many species of fish that contain specific allergens. We concentrated mainly on marine fish allergens, which pays more attention especially abroad. There are not many methods, but methods are still more and more in an attention and a scientits develop new technologies and opportunities.

**Key words:** an allergen, a detection, a fish allergen

---

## Obsah

<b>Obsah.....</b>	<b>2</b>
<b>Zoznam skratiek a značiek.....</b>	<b>3</b>
<b>Slovník termínov.....</b>	<b>4</b>
<b>Úvod.....</b>	<b>6</b>
<b>1 Cieľ práce.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Materiál a metódy.....</b>	<b>9</b>
<b>3 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky.....</b>	<b>10</b>
3.1 Všeobecné pojmy.....	10
3.2 Typy potravín, ktoré sú alergénne.....	13
3.3 Alergie na ryby.....	13
3.4 Metódy detekcie alergénov rýb.....	18
3.4.1 PCR.....	18
3.4.1.1 Real – time PCR.....	21
3.4.1.2 PCR – RFLP.....	22
3.4.1.3 Multiplex – PCR.....	23
3.4.1.4 PCR – SSCP.....	23
3.4.1.5 RAPD – PCR.....	24
3.4.2 ELISA.....	24
3.4.2.1 Detekcia Anisakis simplex pomocou metódy sandwich ELISA.....	26
3.4.3 Biosenzory.....	27
3.4.4 Western Blot.....	27
3.4.5 SDS – PAGE (Polyakrylamidová gélová elektroforéza).....	28
3.4.6 HPLC (High performance liquid chromatography).....	29
3.4.7 Lab – on – a – chip .....	30
<b>4 Návrh na využitie poznatkov.....</b>	<b>31</b>
<b>5 Záver.....</b>	<b>32</b>
<b>6 Zoznam použitej literatúry.....</b>	<b>33</b>

---

## Zoznam skratiek a značiek

**DNA** – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

**dNTP** – deoxyribonukleozidtrifosfát

**ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay, Enzýmová imunoanalýza

**FDA** – Food and drug administration, Potravinová a lieková správa

**g** – gram

**HPLC** – High performance liquid chromatography, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

**IgE** – imunoglobulín E

**IgM** – imunoglobulín M

**kDa** – kilo Dalton, atómová hmotnostná jednotka

**Mab** – monoclonal antibody, monoklonálna protilátka

**mg** – miligram

**ng** - nanogram

**PCR** – Polymerase chain reaction, Polymerázová reťazová reakcia

**ppm** – par per million, časť z milióna

**PCR – RFLP** – Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism, Polymerázová reťazová reakcia – polymorfizmus dĺžky restriktčných fragmentov

**PCR – SSCP** – Polymerase chain reaction – single strand conformation polymorphism, Polymerázová reťazová reakcia - konformačný polymorfizmus jednovláknovej DNA

**RAPD – PCR** – Random amplified polymorphid DNA – Polymerase chain reaction, Náhodne amplifikovaná polymorfná DNA – polymerázová reťazová reakcia

**RNA** – ribonucleic acid, ribonukleová kyselina

**rRNA** – ribosomal ribonucleic acid, ribozomálna ribonukleová kyselina

**SDS – PAGE** – Sodium dodecyl sulfate, polyakrylamidová gélová elektroforéza

**SPR** – Surface plasmon resonance, povrchová plazmónová rezonancia



---

## Slovník termínov

**Antihistaminikum** – liek používaný na zníženie alebo odstránenie účinkov vyvolaných histamínom

**Atopický - alergický**

**Amplikona** – úseky DNA vytvorené po uskutočnení amplifikácie

**Amplifikácia** – množenie

**Biogénny amín** – nízkomolekulárne organické dusíkaté bázy prítomné vo všetkých živých organizmoch

**Cykler** – prístroj

**Deficiencia** - nedostatok

**Enterotoxín** – jedovatá látka, ktorá má nepriaznivé účinky na tráviaci trakt človeka alebo živočíchov

**Epinefrín** – hormón, ktorý dráždi nervové vlákna, je to základný hormón stresovej reakcie

**Epitop** – konkrétna oblasť antigénu, na ktorú sa viažu protilátky

**Glutén** – zmes bielkovín v obilninách

**Glyadín** – bielkovina v lepku

**Histamín** – biologický amín spôsobujúci alergiu

**Histidín** – aminokyselina, ktorej dekarboxyláciou vzniká histamín

**Homológia** - zhodnosť

**Hypersenzitívny** – precitlivelý

**Kadaverín** – mŕtvolný jed

**Katecholamín** – hormón produkovaný dreňou obličiek a vyplavovaný do organizmu pri strese

**Kazeín** – bielkovina obsiahnutá v mlieku

**Kofaktor** – nízkomolekulová neaminokyselinová štruktúra, ktorá spolu s reťazcom aminokyselín tvorí zložené enzýmy

**Laktóza** – mliečny cukor v mlieku

---

**Oligonukleotid** – krátky polymér nukleovej kyseliny, ktorý má zvyčajne menej, ako 20 báz, môžu sa formovať štiepením dlhších úsekov

**Papaín** – enzým štiepiaci bielkoviny na peptidy

**Polymér** – makromolekula zložená z monomérov

**Polymorfizmus** - mnohotvarosť

**Prevalencia** - prevaha

**Primer** – je úsek ribonukleovej kyseliny (RNA), ktorý zohráva dôležitú úlohu v procese replikácie DNA. Je to krátky reťazec, pozostávajúci len z niekoľkých ribonukleotidov - oligonukleotid, na ktorého 3'-OH skupinu dokážu replikačné enzýmy zo skupiny DNA-polymeráz pridávať deoxyribonukleotidy a zahájiť tým tvorbu nového dcérskeho reťazca DNA. DNA-polymerázy totiž dokážu pridávať deoxyribonukleotidy len k už existujúcemu reťazcu nukleovej kyseliny. Preto je primer dôležitý na začiatku procesu vlastnej replikácie DNA

**Putrescín** – toxický acyklický diamín, ktorý vzniká dekarboxyláciou aminokyseliny lizín

**Reverzný** – vratný

**Restrikčný enzým** – enzým, ktorý štiepi dvojvláknovú DNA

**Rigor mortis** – posmrtná stuhnutosť

**Selektivita** - výber

**Segment** - úsek

**Sekvenovanie** – určenie primárnej štruktúry – určenie poradia nukleotidov v DNA reťazec

**Silikagél** – stuhnutý kysličník kremičitý

**Syndróm** – súbor príznakov charakterizujúcich chorobný stav

**Templát** - predloha

**Tyramín** – druh biogénneho amínu

**Validácia** – overovanie

---

## Úvod

Alergie z potravín sú celosvetovým problémom, ktorý postihuje milióny ľudí na celom svete. Prehľad vedeckej literatúry ukazuje, že viac ako 170 potravín, ktoré boli hlásené, môžu spôsobiť alergickú reakciu. U niektorých pacientov s precitlivosťou na jednotlivé alergény môžu aj stopové množstvá po požití alergénu vyvolať život ohrozujúce alergické reakcie. Odhaduje sa, že v USA dostane ročne asi 30 000 ľudí anafylaktický šok, a z toho sa eviduje 150 – 200 úmrtí ročne. Príznaky, ktoré môžu vzniknúť, sa pohybujú od miernych prejavov, ako je napríklad žihľavka, vyrážky na pokožke, až po anafylaktický šok, ktorý môže spôsobovať smrť. Je však ťažké určiť bezpečné, prahové dávky, ktorých prekročenie môže spôsobiť alergickú reakciu. Preto sa vo všeobecnosti odporúča vyhnúť sa týmto alergénom.

Rybacie alergény patria medzi „Big 8“ alergénov, ktoré sú pre konzumentov nebezpečné. Najviac tieto problémy postihujú prímorské oblasti, kde je spotreba rýb vysoká. Najväčšia spotreba rýb je v Ázii. Produkcia a spotreba rýb a morských živočíchov však v poslednej dobe stúpa. Spotrebiteľov však, u ktorých sa vyskytla alergická reakcia na ryby, je taktiež čoraz viac. Vyhybať sa rybám sa odporúča až na úroveň, kedy nie je vhodné ani ovoniavať výpary pri vysmážaní, či pečení. Taktiež bolo dokázané, že vysoké množstvá alergénov sa vyskytujú na rybích trhoch. Bolo dokázané, že výpary pri spracovaní rýb, a teda aj rybích proteínov, môžu spôsobovať u pracovníkov alergickú senzibilizáciu a profesijnú astmu, i keď danú potravinu nezjedia. Dokonca sa uvádza, že je nebezpečné olizovať poštové známky, nakoľko sa tieto vyrábajú z rybacích kostí.

Vyhybať sa týmto alergénom je niekedy však ťažké, pretože spracovávané potraviny, ktoré konzumenti jedia, môžu obsahovať celý rad zložiek, vrátane alergénnych. Potravinárske výrobky môžu byť kontaminované počas spracovania, prepravy a skladovania, a to hlavne kvôli nedostatočnému čisteniu prevádzky a pracovných zariadení a nástrojov a taktiež v prípade histamínu. To môže byť spojené s nedostatočným zmrazovaním rýb. Napríklad mäso tuniaka, či makrely obsahuje veľké množstvo aminokyseliny histidínu, ktorý sa pri nesprávnom skladovaní premení na histamín, ktorý môže vyvolať príznaky podobné alergickým prejavom.

---

Pre zabezpečenie úplnej informovanosti spotrebiteľov o potenciálnych alergénoch Európska rada vydala Smernicu ES/13/2003, ktorá uvádza prísnejšie predpisy a postupy v označovaní potravín. Spotrebiteľ by však mal poznať svoj zdravotný stav a vedieť, či je na nejakú zložku citlivý. Mal by sa naučiť čítať etikety a vedieť o rizikách, ktoré môžu vzniknúť, ak túto potravinu skonzumuje.

Výrobca potravín by si mal uvedomiť, že kvôli zlému označeniu alebo pridaním zložiek, ktoré sa vyskytujú v potravinách „načierne“, ohrozuje život konzumentov a dobré meno svojho výrobku a celej prevádzky.

Testovacie systémy sú preto v podnikoch v potravinárskom priemysle potrebné, aby sa tu dalo testovať, či sa alergény nachádzajú v surovinách a hotových výrobkoch, čo deklaruje o tom, či výrobné linky boli správne dezinfikované. S tým môžu súvisieť aj iné riziká, ktoré nesprávnou sanitáciou vznikajú, ako sú mikroorganizmy, cudzorodé látky a podobne.

Súčasnou požiadavkou potravinárskych podnikov teda sú prístroje a systémy, ktoré sú spoľahlivé, účinné, výkonné, automatické a lacné.

V tejto práci sú opísané prístroje, ktoré sú určené pre detekciu rybích alergénov, a teda aj pre potravinárske podniky najvhodnejšie. Práca je zameraná na detekciu skôr morských rýb, ako sladkovodných, nakoľko príčiny hlásení alergií z morských rýb sú častejšie.

---

## **1 Cieľ práce**

Cieľom tejto práce bolo zhodnotiť alergény, alergie z rýb a hlavným predmetom bolo venovať sa problematike dostupných analytických metód a spôsobov detekcie rybích alergénov v potravinách. Hlavnou úlohou je nájsť tieto metódy, ktoré sa v súčasnosti používajú na detekciu rýb, ako sa na ryby aplikujú, zistiť, v ktorých smeroch sú najvhodnejšie a navrhnúť najvhodnejší a najlacnejší systém detekcie pre podmienky slovenského trhu.

---

## **2 Materiál a metódy**

Materiál a zdroje o problematike detekcie alergénov boli vyhľadávané hlavne v materiáloch cudzojazyčnej literatúry a v literatúre za obdobie posledných 5 rokov. Cudzojazyčná literatúra bola čerpaná hlavne z časopisov a prác, ktoré vypracovali zahraniční autori a ich výskumy a zistené poznatky sú v tejto práci zhrnuté.

---

## 3 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 3.1 Všeobecné pojmy

Alergia je stav precitlivenosti organizmu na určitý alergén. Spôsobuje imunitnú odpoveď a výsledkom je porucha funkcie orgánu. Na potraviny alergicky reaguje: dýchací systém, tráviaci systém, koža...

Pojem precitlivenosť pochádza z gréčtiny (allo - cudzí, ergon - reakcia, činnosť). C. v. Pirquet označil v roku 1906 po prvýkrát ako alergiu všetky od normy sa odlišujúce reakcie ľudského organizmu na zvonku pôsobiace látky. Toto vtedy zahŕňalo precitlivenosť - hyperergiu, ako aj oslabenú citlivosť - hypergiu a chýbajúcu citlivosť - anergiu (URL 6).

Alergény sú antigénne látky schopné navodiť precitlivenosť organizmu, predovšetkým u geneticky predisponovaných jedincov. V užšom zmysle slova sa pod pojmom alergén rozumie látka navodzujúca hypersenzitívnu IgE imunitnú odpoveď. V širšom zmysle slova sa medzi alergény zaraďujú aj kontaktné alergény, ktoré navodzujú bunkový typ imunitnej odpovede. Alergény sú látky prevažne proteínového alebo glykoproteínového charakteru s molekulovou hmotnosťou zvyčajne 5 – 10 kD. Za istých okolností sa však alergénom môžu stať aj látky nebielkovinového charakteru (sacharidy či lipidy a anorganické látky). Na vytvorenie IgE protilátkovej odpovede stačí veľmi malé množstvo antigénu (alergénu). Väčšie množstvo tej istej látky zvyčajne navodí protilátkovú odpoveď typu IgM a IgG, čo sa využíva pri alergénovej imunoterapii (hyposenzibilizácii). Pre neatopickú časť populácie sú alergény celkom neškodné, pretože u neatopikov nevyvolávajú hypersenzitívnu imunitnú odpoveď (Hrubiško, 2003).

Alergia z potravín patrí do rovnakej kategórie alergií, ako napríklad alergia na peľ. V skratke je definovaná ako reakcia imunitnej precitlivenosti na zložky potravy. Po požití stravy, na ktorú má telo alergickú reakciu, spôsobí aktiváciu imunitného systému organizmu. Imunitný systém alergika začne proti alergickej potravine vyvíjať protilátky. Ide o obrannú reakciu, kedy telo produkuje histamín

---

a ďalšie chemické látky, ktoré začnú spôsobovať alergické symptómy. Symptómy alergie sa väčšinou prejavujú okamžite alebo do jednej hodiny po požití potravy, na ktorú má telo negatívnu reakciu. Najčastejšie reakcie sa prejavujú na koži (vyrážky, pupienky), zväčšením jazyka, respiračné problémy, dávenie, vracanie, zápcha, bolesti v brušnej dutine, atď (Klimo, 2007).

Reakcia na alergén môže byť toxická alebo netoxická. Toxické reakcie vyvolávajú toxíny baktérií (stafylokokový, salmonelový enterotoxin) alebo vysoký obsah biogénnych amínov (napr. syndróm po požití zle skladovaných rýb). Netoxické reakcie spôsobujú buď imunitné alebo neimunitné mechanizmy (potravinová hypersenzitivnosť alebo intolerancia) (Hrubiško, 2003). Často si ľudia zamieňajú potravinovú alergiu s potravinovou intoleranciou (Gregora et al., 2006).

Potravinová intolerancia je abnormálna neimunologická reakcia po použití potravy v dôsledku enzymatickej poruchy : napr. intolerancia kravského mlieka pri laktázovej deficiencii, alebo farmakologickej reakcie na chemické produkty v potrave. Falošná potravinová alerggia (pseudoalergia) má klinické prejavy ako pri pravej potravinovej alergii, ktoré sú vyvolané vysokým obsahom biogénnych amínov (histamin, kadaverin, katecholaminy, putrescin, tyramín) (Kayserová, 2004).

Skryté alergény (angl. Hidden) sú také, ktoré kontaminujú potravinu, ale ich obsah nie je známy, resp. deklarovaný v zložení potravy, a preto môžu vyvolať neočakávanú alergickú reakciu. Pacienti s potravinovou alergiou často reagujú na extrémne malé (stopové) množstvá alergénu kontaminujúce inú potravinu. Množstvo alergénu vyvolávajúce reakcie je rôzne pri jednotlivých potravinách ako aj u jednotlivých jedincov. Najčastejšie skryté alergeny sú v tabuľke 1 (Hrubiško, 2003).



Tab. 1 Príklady najčastejších skrytých alergénov (Hrubiško, 2003)

<b>Alergén</b>	<b>Potravina</b>
Aníz, rasca	Sladkosti, likéry, cestoviny, zmesi korenia
Antibiotiká	Kravske mlieko, mäso, vajcia
Arašidy	Materské mlieko, sladkosti, hamburger
Bôb, sója	Výrobky z múky (chlieb, pečivo)
Glutén	Cestoviny, chlieb, pečivo, párky
Kazeín	Párky, náhrady masla, konzervované ryby, upravené mäso, sladkosti, materské mlieko
Kuracie mäso	Šunka
Korenie	Dresingy, majonézy, kečup, omáčky
Mlieko materské	Kravske mlieko, vajce, ryby, arašidy
Mlieko kravske	Sladkosti
Ovocie	Džúsy, nápoje
Orechy, mandle, jadierka	Sladkosti, zmrzlina, exotické jedlá
Papaín	Mäkké syry
Ryby	Materské mlieko
Sója	Hamburgery, čokoládové nápoje
Vajce	Cestoviny, mäsové výrobky, majonéza
Želatína	Najrôznejšie potraviny, farmaká
Živice, gummy	Sladkosti, dressingy, jogurty

---

## 3.2 Typy potravín, ktoré sú alergénne

Hlavné alergény, ktoré podľa EÚ odporúčania (Codex alimentarius) podliehajú povinnému vyznačeniu na potravinách sú tie, ktoré sú aj v minimálnom množstve schopné vyvolať závažnú (fatálnu) alergickú reakciu (URL 6):

- kravské mlieko (0,02ml – 0,005mg) a jeho zložka (laktóza),
- vajcia (0,002 – 1mg),
- ryby, mäkkýše a kôrovce (5mg),
- ovocie a zelenina,
- burské oriešky (0,7 $\mu$ g – 1mg),
- obilniny obsahujúce gliadín- lepok (pšenica - 200 $\mu$ g),
- sója (0,7 - 50 $\mu$ ),
- med.

## 3.3 Alergie na ryby

Ryby sú jednou z najčastejších príčin potravinovej alergie a spolu s arašidmi jedným z najhlavnejších spúšťačov závažných, život ohrozujúcich generalizovaných alergických reakcií. Alergia na ryby hrala významnú úlohu v histórii celého odboru alergológie, pretože práve na nej páni Ptausnitz a Küstner ukázali, že alergická reakcia je vyvolaná faktorom, kolujúcim v krvi pacienta, ktorý reaguje s daným alergénom. Podstatu tohto faktora opísali vedci o niekoľko rokov neskôr (až roku 1967), kedy bol prvýkrát popísaný imunoglobulín E ako spúšťač alergických reakcií (URL 4).

Alergia na ryby sa vyskytuje najčastejšie v dospelosti, ale rovnako môže postihnúť aj deti. Ryby by deti do 3 rokov nemali vôbec konzumovať (Gregora et al., 2004).

Podobne ako alergia na arašidy, aj alergia na ryby je veľmi často celoživotná. Alergény rýb sú vo všeobecnosti bielkoviny rybieho mäsa.

Častejšími príčinami alergií sú skôr morské ryby ako sladkovodné. Často sa prejavuje alergia len na jeden druh ryby, je však 50 % pravdepodobnosť,

---

že alergik bude reagovať na ďalšie druhy. Pravdepodobnosť sa zvyšuje, ak sú ryby druhovo blízke.

Alergén zodpovedný za skrížené reakcie je rezistentný - parvalbumín – proteín viažuci kalcium, odolný voči teplote, nízkemu pH a tráviacim enzýmom. Parvalbumíny sa prevažne nachádzajú vo svaloch, a to oveľa viac v bielom ako v tmavom. Je to prvý alergén, u ktorého bolo popísané jeho presné zloženie (URL 5).

Sú to malé častice o veľkosti asi 12 kDa, zložené zo 108 – 109 aminokyselinových zvyškov. Tieto zistenia umožnila real – time PCR na základe analýzy pomocou špecifických primerov, ktoré umožňujú detekciu rybích alergénov v potravinách (Min, 2009).

Parvalbumín obsahuje kapur, treska, tuniak, losos. Taktiež bolo dokázané, že parvalbumín sa nachádza v troch druhoch makrel (*S. japonicus*, *S. australicus*, *S. scombrus*), a tie sú príčinou najčastejších alergických reakcií na ryby. Toto bolo dokázané v štúdiu, kde bol parvalbumín očistený z bieleho svalstva makrel a reagovali na neho štyria z piatich pacientov (Steinman, 2008).

Ďalší, pomerne nedávno opísaný alergén, ktorý súvisí s konzumáciou rýb, je ich parazit *Anisakis Simplex*. Je ním napadnutých 80 % morských rýb žijúcich v húfoch - tresky, makrely, slede a i.

Ďalšie riziko, ktoré pôsobí na alergika, ale aj nealergika, je tzv. scromboid syndrom. Je to vlastne otrava nadmerným množstvom histamínu (URL 5).

Ryby, hlavne tuniacy a makrely, môžu obsahovať vysoké množstvo histamínu, ktorý v tele vyvolá alergickú reakciu, prejavujúcu sa nevoľnosťou, vracaním, hnačkami, návalmi horúčavy, zčervenáním kože, vyrážkou a žihľavkou. Avšak i niekoľko druhov neskromboidných rýb ako mahi – mahi, sled' a sardinky boli zapletené do incidentov skromboidnej otravy. Histamín vzniká bakteriálnym rozkladom aminokyseliny histidín, ktorú obsahuje rybie mäso. Histamin rozkladajú baktérie z rodu *Enterobacteriaceae*, ktoré štiepia histidín pomocou enzýmu histidín dekarboxyláza a sú schopné vyrobiť v tuniakovi viac ako 500 ppm histamínu. Zvýšené hladiny histamínu sa vyskytujú hlavne vtedy, keď je zanedbávaná hygiena uchovávaní rýb a mŕtve ryby nie sú dostatočne zmrazené, čo vedie k premnoženiu baktérií. Histamín na nebezpečnú úroveň stanovila US

---

Food and Drug Administrativ (FDA), a to na 50 mg histamínu / 100 g (500ppm)(Tsaia, 2005).

Napríklad treska, ako najviac konzumovaná morská ryba, vyvoláva alergiu na koži, ale i podráždenie dýchacích ciest - vrátane astmatických záchvatov. Podobne, i keď v menšom rozsahu, reagujú alergici na mäso haringov, lososov, makrel, sardiniek, tuniakov, krabov, homárov, langúst, kreviet a ďalších tzv. „morských oblúd“ (URL 6).

Ryby sa môžu vyskytovať v potravinách buď v surovom stave, v podobe prášku alebo oleja. Vo väčšine prípadov je táto látka zreteľne označená ako „ryba“ alebo iným podobným opisom. Rybie zložky nie sú obvykle skryté, ale môžu sa nachádzať napríklad v šaláte Caesar dressing alebo v omáčke Worcester, ktorý obsahuje ančovičky. V súčasnosti niektorí výrobcovia skúmajú možnosť pridávania rybacej múky do chleba ako zdroj omega-3 mastných kyselín. Kožné prick testy ukazujú rozsiahle reakcie medzi druhmi rýb, ale nedávny výskum naznačuje, že pacienti môžu byť schopní požiť niektoré druhy rýb aj cez pozitívny test reakcie na jeden alebo dva druhy rýb (URL 7).

Preveniou a zároveň bezpečnou cestou pre ľudí, ktorí sú alergickí na ryby, aby nedostali alergickú reakciu, prípadne anafylaktický šok, je rybám sa vyhnúť. Tiež je treba sa vyhnúť dotyku a akémukoľvek kontaktu s rybami. Lekári dokonca odporúčajú sa im vyhnúť až na úroveň, kedy sa nemajú ani ovoniavať počas varenia (Kunová, 2004).

Za päťročné sledovanie a evidovanie oznámení v systéme RASFF (Rapid allert systém for food and feed) je preukázateľné, že najvyššie percento výstražných oznámení pri potravinách tvoria produkty z rýb - 797 oznámení, čo predstavuje 21% z celkového počtu výstražných oznámení pre potraviny. Až 40% výskytu výstražných oznámení tvoria kovové a chemické kontaminanty, 32% tvorí mikrobiológia a 26% sú kontaminanty ako toxíny a alergény (Luptáková, 2009).

Alergény rýb sú väčšinou termostabilné, to znamená, že tepelnou úpravou sa ich schopnosť vyvolať alergickú reakciu neznižuje. Naopak, alergickú reakciu môže vyvolať prítomnosť alergénu vo vône (výparoch) pri varení, resp. pečení rýb. Závažné alergické prejavy sa môžu prejaviť aj po požití inej stravy pripravovanej v tom istom oleji, resp. na tej istej panvici, na ktorej sa predtým pripravovala ryba. Opísala sa aj alergická reakcia dieťaťa, ktorého dojčiaca matka

---

jedla morské ryby, pričom sa u dojčaťa dokázali špecifické IgE – protilátky (Hrubiško, 2003).

Taktiež vedci v Španielsku skúmali vzorky vzduchu na rybacom trhu pomocou imunochemických metód a zistili, že citliví jedinci by sa mali vyhýbať takýmto trhom v rámci prevencie vyhýbania sa rybím alergénom (Taylor, 2000).

Pre potravinársky priemysel je dôležité zamerať sa na kroky v lepšom označovaní potravinárskych výrobkov. Pre zabezpečenie úplnej informovanosti spotrebiteľov o potenciálnych alergénoch obsiahnutých v potravinách vydala Európska rada a parlament v novembri 2003 Smernicu ES/89/2003, ktorá mení a dopĺňa Smernicu ES/13/2000 a týka sa prísnejšieho označovania potravín (Poms, 2004).

Ryby sú súčasťou tvrdých i mäkkých bujónov. Keďže pri výrobe tvrdých bujónov sa nepoužíva mokré čistenie, je pravdepodobné, že sa čiastočky rýb zachytia v zariadení a kontaminujú následne vyrábaný tvrdý bujón. Preto je potrebné upozorňovať na prípadnú krížovú kontamináciu tvrdých bujónov prostredníctvom preventívneho označenia „výrobok môže obsahovať stopy rýb“. Výroba mäkkých rybacích bujónov je plánovaná tak, že sa vyrábajú posledný deň v týždni na konci poslednej smeny, aby sa predišlo kontaminácii. Po výrobe rybacích bujónov nasleduje efektívne mokré čistenie celej výrobnéj linky, čím sa zamedzuje vzniku krížovej kontaminácie. Z tohto dôvodu nie je potrebné uvádzať preventívne označenie prítomnosti rýb na obaloch mäkkých bujónov (Lopašovský a i., 2009).

Rodičia aj deti sa môžu naučiť kontrolovať etikety. Bohužiaľ, problémom býva rôznorodosť názvov rýb a rybích alergénov. Ak je to možné, citlivosť na rybí alergén by sa mal testovať v každom prípade, ak sú pacienti citliví na kravské mlieko. Veľmi citlivý jedinec na alergén by mal nosiť náramok „Medic Alert“ a dostať epinefrin (adrenalin) v prípade požitia alergénu. Menej citliví jedinci by mali dostať antihistaminika (URL7).

Prevalencia alergie na ryby je rôzna v rôznych geografických oblastiach a závisí od expozície určitého druhu. Medzi alergénmi skupín morských rýb sa vyskytuje skrížená reaktivita, niektoré alergény sú však charakteristické iba pre danú skupinu (čel'ad') rýb. Alergény rýb nereagujú skrížene s alergénmi ostatnej „morskej stravy“, t. j. s kôrovcami a mäkkýšmi (Hrubiško, 2003).

---

Rozdelenie rýb podľa Hrubiška:

a) Treskovité - do radu treskovitých rýb sa zaraďujú dve alergologicky významné čeľade (*Candidae* – treskovité, *Merrlucciidae* – hejkovité). Treska je najčastejšou príčinou alergie na ryby, čo je zapríčinené dvoma skutočnosťami:

- treska je najkonzumovanejšia ryba vôbec (čerstvá, mrazená, údená, solená, pečená, upravené mleté mäso)

- hlavný alergén Gad c 1 („alergén M“,  $M_r$  12,3 kD) sa skladá zo 113 aminokyselín a vykazuje významnú homológiu s parvalbumínmi ostatných rýb, čo dáva široký podklad pre skríženú reaktivitu. Testovanie alergénom tresky sa považuje za optimálne diagnostiku alergie na ryby: pomôže odhaliť viac ako 80% prípadov. Hejk vykazuje s treskou vysoký stupeň skríženej reaktivity.

b) Makrelovité – do tejto čeľade sa zaraďuje predovšetkým makrela (*Scomber scombrus*), od nej sa líši nepravá makrela (*Trachurus japonicus*) a tuniak (*Thunnus albacares*). Hlavný alergén makrely v 20% prípadov skrížene reaguje s treskou, je však termolabilný. Obsah histidínu v mäse makrely je rovnako vysoký ako u tuniaka. Tuniak je veľká morská ryba, jeho alergén má 55% reaktivitu s treskou a makrelami. Konzervované mäso stráca schopnosť vyvolať alergickú reakciu (alergén sa z väčšej časti rozkladá). Konzumácia mäsa v surovom stave (japonské národné jedlá – sushi a sashimi) býva príčinou závažných alergických prejavov. Nesprávne spracované a skladované tuniaky a makrely obsahujú vysoké množstvo histamínu. Konzumácia takéhoto mäsa vyvolá tzv. skromboidnú otravu.

c) Lososovité – Losos (*Salmo salar*) nie je typická morská ryba, rozmnožuje sa v sladkovodných riekach. Skrížená reakcia s treskou sa prejavuje asi u 20% pacientov. Parvalbumín lososa Sal s 1 je labilnejší ako parvalbumín tresky, konzerváciou (nie varením a pečením) sa jeho alergénnosť výrazne zníži. Mäso lososa obsahuje tiež väčšie množstvo histamínu. Do čeľade lososovitých patrí aj pstruh (*S. trutta*). Alergické prejavy sa pri tejto rybe nepozorujú.

d) Sardinky – (*Sardinops melanosticta*) sú príbuzné so šprotmi, sledmi, sardelami, heringami a ančovičkami. Tvoria asi 20% spotreby rýb. Alergia sprostredkovaná IgE nie je častá, obsahujú však histamin a puríny.

---

### 3.4 Metódy detekcie alergénov rýb

Vyhýbanie alergikov pred alergénmi býva niekedy celkom ťažké, nakoľko výrobok obsahuje celý rad spracovávaných zložiek, vrátane potenciálnych alergénov. Potravinárske výrobky môžu byť kontaminované „cudzími zložkami“ počas spracovania, prepravy, skladovania alebo nedostatočným čistením zariadení. Preto priemyselné inštitúcie potrebujú spoľahlivé metódy na detekciu alergénov v potravinárskych výrobkoch. V súčasnosti existuje niekoľko technických možností potenciálnych alergénov. Používané metódy sú buď so zameraním na konkrétny alergén alebo markér. Metódy musia byť dostatočne citlivé, aby mohli zistiť konkrétny alergén a zabránili tak vyvolaniu alergickej reakcie u citlivých jedincov (Poms, 2004).

Hlavnou požiadavkou je taktiež selektivita. Jasným príkladom tejto požiadavky sú práve ryby a kôrovce, kde alergickú reakciu je schopné spustiť veľké množstvo druhov. Z tohto dôvodu metódy na zisťovanie rýb a kôrovcov v potravinách by mali byť špecifické a konkrétne. Avšak táto špecifickosť aj znamená, že každý z druhov rýb a kôrovcov vyžaduje vlastnú špecifickú metódu analýzy. Prakticky by bolo teda vhodnejšie, aby metódy boli schopné detegovať niekoľko druhov v jednej analýze. Kvôli tejto otázke selektivity je v súčasnej dobe obmedzený výber metód (Hengel, 2007).

#### 3.4.1 PCR

Polymerázová reťazová reakcia (angl. Polymerase chain reaction) je metóda molekulárnej biológie, ktorá slúži na amplifikáciu (zmnoženie) DNA molekúl v laboratórnych podmienkach, využívajúc enzým DNA – polymerázu. PCR je exponenciálna reakcia a teoreticky je možné aj z jedinej molekuly DNA amplifikovať ľubovoľné množstvo molekúl. Táto metóda bola revolučným objavom Američana Karyho Mullisa v roku 1983 (Nobelova cena za chémiu v roku 1993) a v súčasnosti je absolútne kľúčová pre prácu s DNA. Žiadna DNA-polymeráza nezačne syntézu komplementárneho vlákna DNA bez tzv. primeru. Primer je krátky oligonukleotid, ktorým sa iniciuje replikácia DNA v

---

podmienkach živej bunky, ale taktiež aj v laboratórnych podmienkach (*in vitro*). Často nie je potrebné namnožiť celú molekulu DNA, ale len niektoré jej úseky (napr. gény). Do PCR reakcie sa štandardne pridávajú dva odlišné oligonukleotidy v rovnakej koncentrácii, ktorými sa „označí“ ľavý (priamy primer) a pravý koniec (reverzný primer) amplifikovanej DNA. Dochádza teda k namnoženiu len takých kusov DNA, ktoré sú ohraničené týmito primermi. Okrem toho každá DNA-polymeráza vyžaduje ako kofaktor pri polymerizácii horečnaté katióny ( $Mg^{2+}$ ) a v podmienkach *in vitro* aj vlastný tlmivý roztok (pufor), pri použití ktorého má optimálnu aktivitu a stabilitu. DNA-polymeráza, primery, horčík, pufor a dNTP sa riedia v sterilnej destilovanej vode, výsledkom čoho je tzv. mastermix. PCR reakcia je veľmi citlivá na kontamináciu, a preto sa pri príprave roztoku mastermixu vyžaduje veľmi precízna a sterilná práca. Napokon sa do mastermixu pridáva vzorka DNA, ktorú chceme (resp. jej časť) amplifikovať. Nazýva sa templátová DNA. Takto pripravená PCR reakčná zmes sa vkladá do samotného prístroja na PCR reakciu, ktorý sa nazýva termálny cyklér alebo len cyklér. Podmienkou replikácie DNA je jej denaturácia, t.j. oddelenie dvoch vlákien dvojvláknovej DNA. K tomu je potrebná vysoká teplota (cca  $90^{\circ}C$ ). Do PCR reakcie sa preto pridáva termostabilná Taq-polymeráza (DNA-polymeráza izolovaná z termofilnej baktérie *Thermus aquaticus*, ktorá žije v termálnych prameňoch), ktorej optimum polymerizácie je pri teplote  $72^{\circ}C$ . V súčasnosti existuje viacero „typov“ rekombinantných Taq-polymeráz dodávaných rôznymi biotechnologickými firmami. Nasleduje anelácia - za poklesu teploty na cca  $37-65^{\circ}C$  (závisí od dĺžky a sekvencie primerov) nastáva hybridizácia primerov s templátovou DNA na komplementárnych miestach. Posledná je polymerizácia - zvýšením teploty na  $72^{\circ}C$  začína Taq-polymeráza syntetizovať komplementárne vlákno DNA z voľných dNTP (deoxyribonukleozidtrifosfáty potrebné ako „stavebné čiastočky“ k syntéze nových molekúl) (URL 8).

Pre rutinnú použiteľnosť PCR je potrebné splniť viacero požiadaviek. V posledných rokoch sa podarilo splniť požiadavky definovanej selektivity, zábrany kontaminácie a kontroly úspešnosti amplifikácie jednotlivých vzoriek. Požiadavky, ktoré ešte nie sú celkom splnené, sú zabezpečenie vysokej citlivosti v potravinovej matrici a kvantifikácia. Taktiež zavedenie kvantifikácie je v prípade dôkazu alergénov pomocou PCR stále problematické. (Brežná, 2008).



---

V snahe overiť obchodné podvody s rybím filé z garupa (*Epinephelus marginatus*), ktorý býva zámerne nahrádzaný s Ostriežom nilským (*Lates niloticus*) a Polyprionom americkým (*Polyprion americanus*), sa vedci Asensio L. et al. (2009) v Španielsku snažili vyvinúť PCR v snahe odhalenia týchto podvodov. Garupa je v Španielsku vysoko oceňovaná ryba, vzhľadom na výborné vlastnosti mäsa. Tento druh často stojí na trhu okolo 30 – 40 Eur za kilogram. Preto je táto vysoko cenená, populárna ryba často transformovaná na filety a je vystavená nahradením lacnejšími príbuznými druhmi. Oligonukleotidy boli vyformované z 12S ribozomálneho RNA génu a vytvorené PCR fragmenty mali dĺžku 100, 138 a 169 pre garupa, polypriona a ostrieža. Špecifickosť primerov bola testovaná u vyše 50 druhoch rýb. Navyše v tejto práci bolo skúmaných 70 vzoriek rybieho filé a u 58 bolo dokázané, že sú nesprávne označené, a teda klamlivé pre spotrebiteľa.

PCR bola taktiež použitá na identifikáciu konzervovaných tuniakov, bonita a makrel. Vedci Ram a Baidoun (1996) v Detroite zistili, že konzervačný proces degraduje DNA tuniakov na menej ako 123 párov báz (bp). Preto primery boli navrhnuté tak, aby amplifikovali krátku sekvenciu mitochondriálneho cytochróm b génu. Podľa tohto PCR boli spoľahlivo identifikované druhy tuniaka (*Thunnus albacares*, *Thunnus alalunga*, *Katsuwonus pelamis*), bonito (*Euthynnus affinis*) a makrel (*Auxis thazard*) v plechovkách.

Výroba komerčných kitov pre identifikáciu druhov rýb bola v posledných rokoch pokroková. PCR sady obsahujú všetky potrebné činidlá, kontroly a príslušenstvo pre rýchle testovanie. Napríklad spoločnosť Tepnel Biosystems poskytuje DNA kit pre identifikáciu rýb vo výrobkoch. Pomocou ich kitu môžu byť detegované napr. treska, pstruh, či losos. Ďalej spoločnosť Biotools ponúka Biofish zostavy: Biofish Cod kit pre identifikáciu tresky alebo Biofish Salmon kit pre identifikáciu lososa. Taktiež spoločnosť Bionostra vyvinula ďalšie kity pre identifikáciu druhov rýb. FishID kit je špeciálne určený na vykonávanie rýchlych a konkrétnych označení obchodných rýb na základe analýzy mitochondriálnej DNA. Je založený na amplifikácii špecifických sekvencií DNA. Tento kit umožňuje identifikáciu veľkého počtu druhov rýb, ako sú treska, merlúza, platesa, jeseter alebo tuniak a mnoho iných (Gil, 2007).

---

#### 3.4.1.1 Real-time PCR

Najúčinnejšou a zároveň najznámejšou metódou analýzy rýb v potravinových produktoch je real - time PCR metóda. Real – time polymerázová reťazová reakcia je založená na Taqman – MGB sonde a bola vyvinutá práve pre detekciu parvalbumínu. Test má citlivosť až 5 pg. Táto metóda je založená na zväčšení DNA fragmentu, ktorý sa nachádza v rôznych druhoch rýb. Real - time PCR monitoruje emitovanú fluorescenciu počas PCR reakcie. Zvyšovanie fluorescencie indikuje amplifikáciu DNA v reálnom čase (na rozdiel od konvenčnej PCR - deteguje sa až po skončení reakcie). Používa sa tu Real- time prístroj (Lochman et al., 2004).

SureFood ® Alergen Fish real-time PCR je konkrétny kit na analýzu rýb v potravinárskych výrobkoch. Metóda využíva relatívnu stabilitu DNA, ktorá odoláva aj silným krokom počas spracovania pri výrobe potravín. DNA je zväčšená a detegovaná s vysokou citlivosťou a špecifickosťou. Postup sa riadi základnými princípmi real-time PCR metódou pre amplifikáciu DNA. Dva primery nasadajú na cieľovú DNA prítomnú iba v rybách. Amplifikovaný DNA segment je detegovaný hybridizáciou a označený fluorescenčným farbivom na svojom 3' a 5' konci. Nárast fluorescencie sa meria v reálnom čase. Táto reakčná zmes obsahuje aj kontrolný DNA templát. DNA je pridávaná do reakcie a výsledky negatívnej amplifikácie indikujú prítomnosť PCR inhibítorov vo vzorke . Vyhodnotenie výsledkov je vykonávané podľa doporučení výrobcu prístroja (URL9).

Sotelo et al. (2003) používajú Taqman test pre identifikáciu tresky. Trotta et al. (2005) používajú real - time PCR pre identifikáciu ostrieža v rybích filé. Hird et al. (2005) použil real – time PCR na identifikáciu tresky. Lo´pez a Pardo (2005) použili túto technológiu pre identifikáciu tuniaka.

Hildebrandt (2010) využil real-time PCR na detekciu Sal s 1, hlavného alergénu lososa. Pomocou tejto metódy vedci chceli stanoviť tento alergén, ale popritom určiť dôsledky spracovania potravín na schopnosť tento alergén detegovať. Vzorka sa varila 60 minút a odchýlka pri stanovovaní sa zistila 20%. I napriek odchýlkam tento test uvádzajú ako spoľahlivý.

---

#### 3.4.1.2 PCR – RFLP

Metóda PCR – RFLP (Restriction fragment length polymorphism – polymorfizmus dĺžka restrikčných fragmentov) využíva existenciu restrikčných endonukleáz, ktoré štiepia polynukleotidový reťazec prerušením fosfodiesterových väzieb v určitých špecifických sekvenciách. Získané fragmenty, ktorých veľkosť a počet závisí od prítomnosti, respektíve neprítomnosti štiepneho miesta sa detegujú elektroforézou v agarózovom géle s obsahom etídium bromidu. Podstata metódy spočíva v prvotnom namnožení (naamplifikovaní) dostatočného množstva PCR produktu a následnom štiepení pomocou restrikčnej endonukleázy, ktorá je schopná na základe špecifického rozpoznávacieho miesta štiepiť nasyntetizovaný PCR produkt. Výsledné fragmenty sa nazývajú štiepne produkty (URL 20).

Táto metóda je uznávaná spomedzi iných metód pri identifikácii rýb, lebo je oveľa jednoduchšia a menej nákladnejšia. Táto metóda bola použitá na identifikáciu druhov makrel, konzerv tuniaka, druhov úhorov alebo iných výrobkov z rýb (Gil, 2007).

PCR – RFLP sa používa na detekciu rybích ikier rodu *Messolongi*. Rybie ikry *Messolongy* sú preslávený produkt pochádzajúci z Grécka. Pochádzajú z vaječníc rýb *M. cephalus*, ktoré sú zachytené v lagúne Messalongy v Grécku. Tieto rybie ikry bývajú často zamieňané za ikry rodov napr. *Chelon labrosus*, *Liza saliens* či *Liza aurata*. Na univerzite v Grécku preto vedci vyvinuli metódu PCR – RFLP na odhalenie zamieňania týchto ikier, ktorá bola použitá na amplifikáciu mitochondriálneho 16s rRNA génu. PCR produkty s restrikčnými enzýmami *Bst*NI, *Taq*I a *Hinf*I s následným použitím elektroforézy v agarózovom géle priniesli druhovo špecifické restrikčné vzory, ktoré umožnili jasnú identifikáciu kaviára z rýb *Messolongi* a kaviára z iných druhov (Kilia, 2002).

Táto metóda bola využitá aj na identifikáciu šiestich druhov tuniaka v konzervách. Test vykonávali vedci v Španielsku. Počas procesu konzervovania bola DNA degradovaná v svalovine rýb: veľkosť DNA fragmentu sa pohyboval od <100 až 200 bp. Primery, ktoré boli použité boli kompatibilné k cytochrómovému génu so 126 bp. Boli tu použité restrikčné enzýmy *Bsi*YI, *Mbo*I, and *Mn*II. Tento test sa preukázal ako spoľahlivý na detekciu šiestich druhov tuniaka v rybích konzervách (Quinteiro, 1998).

---

PCR – RFLP bola použitá na identifikáciu merlúzy s použitím restriktčných enzýmov ApoI, DdeI, DraIII, and MboII na Inštitúte Biochémie a chémie v Hamburgu. Druhá identifikácia podľa PCR-RFLP metodík je užitočná v rôznych situáciách, vrátane overenia tepelne spracovaných potravín, detekcie zložiek potravín a určenia druhu rýb, ktorých morfológické znaky sú vplyvom spracovania odstránené (Quinteiro, 2001).

#### 3.4.1.3 Multiplex – PCR

Táto metóda funguje na takom princípe, že v jednej reakčnej zmesi je viac primerových párov, takže prebieha amplifikácia viacerých úsekov DNA v rovnakom čase (URL 8).

Táto metóda sa využíva na overenie makrel rodu *Scomber* vo výrobkoch z rýb. Túto metódu s využitím na detekciu makrel skúmali vedci v Španielsku. Táto metóda pozostáva z dvoch nových ampliconov - *Scomber japonicus* (104 bp) a *Scomber australicus* (143bp). Taktiež zahŕňa už skôr opísané *Scomber colias* (159 bp) a *Scomber scombrus* (123 bp). Táto metóda bola skúmaná na 40 vzorkách vrátane 28 konzerv a 12 nespracovaných filet. Pozitívny nález bol zaznamenaný vo všetkých prípadoch podľa ich obchodného označenia. Celkovo sa táto metodika javí ako potenciálny nástroj na priame použitie v overovaní makrel *Scomber* v rybacom morskem priemysle (Catanese, 2010).

#### 1.4.1.4 PCR – SSCP

Metóda (*single stranded conformation polymorphism*) je založená na princípe rôznej migrácie jednovláknových molekúl DNA, ktoré sa líšia svojou sekundárnou štruktúrou (konformáciou) v nenedaturačnom polyakrylamidovom géle. Konformácia jednovláknového fragmentu DNA je daná intramolekulárnymi interakciami vo vnútri sekvencie DNA. Úspech tejto metódy spočíva vo viacerých faktoroch. Najdôležitejším faktorom je dĺžka analyzovaného fragmentu. Táto technika zachytáva fragmenty menšie ako 200 bp. Druhým faktorom je zabezpečenie konštantnej teploty, ktorá stabilizuje konformáciu ssDNA počas

---

elektroforézy. Teplota pri elektroforéze ovplyvňuje kvalitu rozlíšenia DNA fragmentov (URL 15).

PCR – SSCP sa ukázala úspešná pre identifikáciu produktov rybolovu, ako je losos, pstruh, úhor alebo jeseter, konzervovaný tuniak, ostriež, garupa, či polyprion. Táto technika dokáže identifikovať blízko príbuzné druhy na rozdiel od RAPD alebo RFLP (Gil, 2007).

#### 3.4.1.5 RAPD – PCR

Metóda RAPD (*random amplified polymorphic DNA* – náhodne amplifikovaná polymorfna DNA) je metóda pre tvorbu genómového fingerprintu (odtlačku) pri druhoch, pri ktorých nie je známa sekvencia, ktorú budeme amplifikovať. Používajú sa krátke, málo špecifické oligonukleotidy o dĺžke 10 nukleotidov. Pre získanie reprodukovateľných výsledkov sú kritické nasledovné faktory: presná optimalizácia koncentrácie DNA, reprodukovateľnosť cyklu, kvalita a koncentrácia primerov, výber DNA polymerázy a presnosť pipetovania. Metóda vykazuje vysoký stupeň polymorfizmu, a preto môže byť vhodná pre tvorbu genetických máp, fingerprinting. Hlavné výhody spočívajú v nízkych nákladoch a malej pracnosti (URL 20).

Metóda je preto veľmi jednoduchá aj bez znalosti genetickej výbavy rýb. Toto je hlavná výhoda tejto metódy. Táto technika bola použitá pre diskrimináciu populácie hilsa, druhov úhora, barbusa, tilapia, lososa, polypriona, garupa. RAPD – PCR však nie je vhodná pre druhovú identifikáciu vo výrobkoch, ktoré obsahujú zmesi druhov a nie je pravdepodobne vhodná pre analýzu silne degradovaného materiálu (Gil, 2007).

#### 3.4.2 ELISA

ELISA súpravy sú založené obvykle na báze monoklonálnych a polyklonálnych protilátok na detekciu reziduí cudzorodých látok v potravinách a krmivách a na kontrolu kvality mäsových a mliečnych výrobkov. Detekčný krok zahŕňa väzbu protilátky, ktorá reaguje s konkrétnym substrátom. (URL3).

---

Protilátky získané na detekciu alergénov alebo špecifických bielkovín v potravinách sú získávané od cicavcov, ako sú myši, králiky, kozy a ovce. Avšak v tomto prípade vznikajú spory, lebo protilátky získané od cicavcov sa odoberajú z krvi, čo znamená časté vykrvácanie alebo až zabitie imunizovaných zvierat (Ullrich, 2009).

Jedná sa o presné a rýchle screeningové metódy, ktoré umožňujú získať výsledky niekoľkonásobne skôr a lacnejšie ako pri použití tradičných metód. Na rozhodujúcich pracoviskách je nutné z dôvodov právnej platnosti výsledkov potvrdzovať pozitívne nálezy metódami predpísanými platnou normou. K práci s testami je potrebný bežný laboratórny materiál. Odčítanie možno vykonávať v niektorých prípadoch vizuálne, avšak k odčítaniu kvantitatívnych výsledkov je potrebný špeciálny spektrofotometer na čítanie mikrotitračných doštičiek s príslušným filtrom (450 nm, resp. 650 nm)(URL 3).

Detekcia rybích bielkovín v potravinách bola v minulosti založená na využití sér pacientov (Faeste, 2008).

ELISA je v súčasnosti najpoužívanejšia analytická metóda pre rutinné merania a skrining alergénov v potravinách. Nakoľko sú ELISA testovacie súpravy jednoduché a rýchle, stali sa komerčne dostupné pre veľa potravinových alergénov s medzou stanoviteľnosti 0,05 – 10 mg/kg v závislosti na alergén a potravinovú maticu (Ullrich, 2009).

Výpary z rýb a ich proteínov v priebehu spracovania boli identifikované ako potenciálna cesta pre alergickú senzibilizáciu a profesijnú astmu u pracovníkov zapojených do takto rizikovej činnosti. Cieľom štúdií v Južnej Afrike bolo vyvinúť imunologické testy na kvantifikáciu aerosólu z rybích antigénov v továrni na spracovanie rýb. Polyklonálne protilátky na hlavné druhy rýb spracované v továrni (sardinky a sardely) boli vyvinuté u králikov a toto bolo využité na rozvoj ELISA testu na detekciu rybích antigénov. Výsledkom bola citlivosť ELISA testov na jednotlivé rybšie alergény (Lopata, 2005).

ELISA je špecifická pre ryby a nedochádza u nej ku krížovej reakcii s inými druhmi. Dá sa s ňou detegovať prítomnosť parazita *Anisakis simplex* a parvalbumín. Napríklad citlivosť ELISA na parvalbumín v treske je 0,01 mg parvalbumínu/kg potraviny, čo sa javí ako dostatočné na odhalenie stôp rybích

---

bielkovín v potravinách, aby sa minimalizovalo riziko pre spotrebiteľa alergickej reakcie na rybu (Faeste, 2007).

#### 3.4.2.1 Detekcia *Anisakis simplex* pomocou metódy sandwich ELISA

*Anisakis simplex* je háďatko parazita, ktorý môže infikovať ľudí, ktorí jedia surové alebo nedostatočne tepelne upravené morské plody. Parazituje na rôznych druhoch rýb, hlavonožcoch a morských cicavcoch. Larvy infikujú sliznicu tráviaceho traktu vylučovaním proteínov, ktoré sa podieľajú na patogenéze anisakiázy a môžu vyvolať príznaky sprostredkované IgE. Anisakiáza je ochorenie vedúce k zažívacím príznakom. Alergia na *Anisakis simplex* bola hlásená ako alergická reakcia 1. typu precitlivenosti (žihľavka – angioedém, anafylaxia, zápal spojiviek a astmy).

V diagnostike anisakiázy bol vyvinutý špecifický IgE namierený proti Ani s 1, ktorý má vysokú presnosť. Protilátka, ktorú ELISA obsahuje, bola založená na základe monoklonálnej protilátky 4F2. Navyše v tejto detekcii na Ani s 1 bola prvýkrát vyskúšaná 2-site sandwich ELISA, kde boli použité tieto MAB protilátky získané z králika. Tento test je špeciálny, pretože nevzniká žiadna krížová reakcia s inými extraktmi a je vysoko citlivá (limit detekcie je 1-8 ng/ml), pričom je schopná detekovať Ani s 1 v rybích extraktoch z tresky a čerta. Na detekciu Ani s 1 v skúšobných testoch sa používa ako jeho náhrada rekombinantný alergén Rani s 1 s rovnakými imunologickými vlastnosťami získaný z *Escherichie coli*, nakoľko čistenie prírodného Ani s 1 je pracné a nákladné.

ELISA bola v tomto prípade vyvinutá na detekciu Ani s 1 v obchodných rybách priamo a navyše bolo zistené, že *Anisakis simplex* sa údajne môže nachádzať aj v kuracom mäse, nakoľko boli sliepky kŕmené vysokým podielom rybacej múčky (Arilla et al, 2008).

ELISA dokáže detekovať nielen Ani s 1, ale aj Ani s 7. Vedci v Španielsku zistili, že anti – Ani s 1 pretrváva v sére dlhšie ako anti – Ani s 7 a toto rôzne pretrvávanie môže pomôcť klinickým lekárom v diagnostike rozlišovať medzi nedávnou a staršou infekciou Anisakisom (Anadón, 2009).

---

### 3.4.3 Biosenzory

Biosenzory sú jednou z bioanalytických metód. Využívajú najmä enzýmy, protilátky alebo DNA v kombinácii s príslušným detekčným zariadením, tzv. prevodníkom, ktorý pracuje zväčša na elektrochemickom alebo optickom princípe. Biologická časť biosenzora (napr. enzým) a prevodník (napr. elektróda) tvoria jeden celok. Výhody použitia biosenzorov sú kombinácia klasických výhod sensorov (miniaturizácia, nenáročnosť na prístrojové vybavenie, presnosť, nízka cena, rýchla odozva, spoľahlivosť) a výhod bioanalytických metód (vysoká špecifita) (URL 10).

SPR biosenzor (povrchová plazmónová rezonancia) bol vyvinutý práve na detekciu parvalbumínu v potravinách. Biosenzor SPR umožňuje detekciu parvalbumínu do 5 min a má medzu stanoviteľnosti nižšiu ako  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  a vyzerá to tak, že tento senzor bude rýchly a silný nástroj na detekciu a kvantifikáciu parvalbumínu ako alergénu v potravinách. Biosenzory sú technológie, ktoré sa začali vyvíjať iba v poslednom desaťročí. Venuje sa im pozornosť hlavne v analýze potravín a detekcii alergénov. Avšak údaje o validácii sú stále nízke (Ullrich, 2009).

### 3.4.4 Western blotting

Western blotting je užitočný pre identifikáciu a kvantifikáciu proteínov v komplexnej zmesi proteínov. Pri technike Western blot sú proteíny elektroforeticky rozdelené, prenesené z gélu na pevný nosič (nitrocelulózoový filter, nylónová membrána) a značené reagensiami, ktoré sú špecifické pre určitú sekvenciu aminokyselín. Ako „sondy“ sa používajú protilátky, ktoré reagujú špecificky s antigénnymi epitopmi cieľových proteínov, naviazaných na pevnom nosiči. Na vizualizáciu väzby proteín : protilátka sa používa obyčajne ešte sekundárna protilátka (napr. proteín A), ktorá je zviazaná s alkalickou fosfatázou, zabezpečujúcou farebnú reakciu so špecifickým substrátom (URL11).

Vedci v Laboratóriu patológie a nutričnej výživy zistili, že Western blot umožňuje charakterizovať rybacie proteíny z výťažkov pripravených za rôznych podmienok, pred *rigor mortis* a post *rigor mortis* z tresky. Taktiež zistili, že doba skladovania vplyva na množstvo IgE reaktívnych proteínových úsekov, lebo



---

prostredníctvom Western blot objavili 18 – kDa úsek iba u rýb, ktoré boli skladované niekoľko dní (Dory, 2007).

Pomocou tejto techniky bol detegovaný v tom istom laboratóriu vo Francúzsku nový, 41 kDa proteín z tresky, ktorý bol očistený zo surového extraktu z tresky pomocou síranu amónneho a zistili, že je podobný alergénu Gad c 1 (Galland, 1998).

Štúdie tuniaka s použitím Western blotu v Amerike zistili špecifický a hlavný proteín prítomný v tuniakovi s molekulovou hmotnosťou 46 kDa (Yamada, 1999)

### **3.4.5 SDS – PAGE (Polyakrylamidová gélová elektroforéza)**

Účelom SDS – PAGE je oddeliť bielkoviny v závislosti od ich veľkosti.

SDS denaturuje bielkoviny tak, aby sa zachovala ich primárna štruktúra. Pomocou SDS majú proteíny rovnaký, lineárny tvar. SDS (dodecyl sulfát sodný) umožňuje rozpúšťať hydrofóbne molekuly. Konečným výsledkom je, že všetky bielkoviny majú primárnu štruktúru a majú záporný náboj, čo znamená, že všetky sa posúvajú smerom ku kladnej časti elektrického poľa, bez separácie podľa veľkosti. Bielkoviny sa dajú potom do prostredia, ktoré umožňuje ich rozdeliť podľa veľkosti. Týmto prostredím je polyakrylamid. Tento polymér sa premení na gél a prostredníctvom elektrického prúdu nastáva pohyb bielkovín (URL 12).

Vedci v Haukelandskej unievrzitatej nemocnici v Nórsku skúmali pomocou SDS – PAGE krížové reakcie medzi jednotlivými druhmi rýb. Skúmali tresku, lososa, makrelu, tuniaka, sled'a, sumca, halibuta a platesu. Ako ukázali výsledky testu, treska, losos, sled' a sumec vyvíjajú vysokú krížovú reakciu, zatiaľ, čo makrela, halibut, tuniak a platesa vykazujú nízke krížové reakcie. Toto vedci potvrdzovali na sérach pacientov a zistili, že 9 pacientov z 10 reaguje na tresku a lososa (Van, 2005).

SDS – PAGE technikou skúšali vedci vo Francúzsku v deviatich laboratóriách identifikovať desať druhov komerčne známych rýb po varení (napr. pstruh dúhový, pstruh obyčajný, losos obyčajný, losos ružový, treska alijašská, sivoň alpský, merlúza). Pomocou SDS – PAGE mali tri laboratóriá ťažkosti

---

s identifikáciou *S. trutta*, avšak táto technika sa overila ako stopercentná pri identifikácii všetkých druhov *Oncorhynchus* (pstruhy), preto sa javí ako vhodná technika na identifikáciu rýb po uvarení (Etienne, 2000).

### 3.4.6 HPLC (High performance liquid chromatography)

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC) je analytická metóda vhodná na separáciu a stanovenie látok v roztokoch (URL 13).

U kvapalinovej chromatografie je delená zmes rozpustená v kvapaline, ktorá preteká cez vrstvu tuhého materiálu s aktívnym povrchom. – stacionárnu fázu. Ako stacionárna fáza sa používa najčastejšie silikagél, oxid hlinitý a celulóza. Zdokonalenie kvapalinovej chromatografie viedlo k vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii. Ako stacionárna fáza sa používajú špeciálne, veľmi jemné nosiče s vysokoaktívnym povrchom umiestnené v oceľových trubiciach a kvapalina nimi preteká pod vysokým tlakom 10-50 MPa. Proces delenia je automatizovaný, prítomnosť čistých látok sa zisťuje detektorom, ktorý je na výstupe z kolóny. Detekcia sa deje najčastejšie meraním absorpcie v ultrafialovej oblasti spektra, prípadne meraním indexu lomu prechádzajúcej mobilnej fázy (URL 14).

Touto metódou sa zisťovala príčina otráv z rybacích konzerv z makrel na Taiwane, kde v roku 2001 došlo k otravám u troch obetí z dôvodu požitia mäsa z konzerv. Táto metóda sa využila v roku 2005 na oddelenie biogénnych amínov, za účelom stanovenia kvality konzervovaných rybacích výrobkov. Pomocou nej sa zistila vysoká úroveň histamínu, a to 153,9 mg/ 100 g, čo je podľa noriem FDA neprípustné (50 mg/ 100g), čo deklaruje o tom, že toto množstvo histamínu bolo pre tieto obeť toxické (Tsaia, 2005).

V Nórsku sa pomocou HPLC detegovali dva alergénne parvalbumíny vo svale tresky alijašskej, ktorá je celosvetovo známy obchodný druh (Thien, 2004).

Pomocou HPLC sa stanovoval histamín vo vzorkách potravín a táto metóda sa javí ako dostatočná, nakoľko hranica kvantifikácie je 0,2 mg/kg, čo je veľmi citlivé na určenie histamínu (Penga, 2008).

---

Taktiež vedci v Nórsku dokázali, že pomocou HPLC sa dá identifikovať Sal s 1, hlavný alergénu lososa atlantického a parvalbumin  $\beta$ , alergén tresky (Lindsrom, 2003)

### **3.4.7 Lab - on - a - chip technológia**

Pomerne nová technológia skúmaná v poslednom období. Táto technológia, ktorá využíva mikrofluidné zariadenie bola využitá na detekciu druhov rýb a Dooley et al. (2005) ju využili na detekciu prímiesí lososa / pstruha. Títo autori dosiahli detekciu 5% lososej DNA vo výrobkoch zo pstruhov. Títo autori tiež využili túto metodiku v laboratórnych štúdiách na odhalenie rýb v potravinárskych výrobkoch. Na tieto účely autori použili Agilent 2100 Bioanalyser.

Táto technológia využíva sieť kanálikov a priehlbínok, ktoré sú umiestnené na sklenenom alebo plastovom čipe, aby vybudovali minilaboratórium. Tlak alebo elektrokinetická sila presúvajú pikolitrové objemy cez kanáliky za presne riadených podmienok. Čip umožňuje manipuláciu so vzorkou, miešanie, riedenie, elektroforetickú a chromatografickú separáciu, farbenie a detekciu v jedinom integrovanom systéme.

Vďaka štandardizácii a automatizácii sú hlavné výhody Lab-on-a-Chip produktov jednoduchosť používania, rýchlosť analýzy, nízka spotreba vzorky a chemikálií a vysoká reprodukovateľnosť (URL 16).

---

## 4 Návrh na využitie poznatkov

V poznatkoch, ktoré sú v tejto práci zhromaždené je vytvorený prehľad o súčasných metódach detekcie, ktoré majú využitie v laboratóriách a výskumných ústavoch, ale môžu byť i výbornou pomôckou pre firmy v potravinárskom priemysle. Pre toto odvetvie priemyslu je jasnou prioritou spoľahlivosť, rýchlosť a cena.

Jemnú rovnováhu medzi jednoduchosťou, dostupnosťou, vysokou citlivosťou, a hlavne cenou možno nájsť u ELISA s použitím protilátok. ELISA je metóda, ktorá sa používa najčastejšie v potravinárskom priemysle na stanovenie alergénov s medzou stanoviteľnosti od 0,05 do 10 mg. kg<sup>-1</sup>. ELISA metóda sa zatiaľ javí ako najvhodnejšia pre slovenský trh z hľadiska dostupnosti, ceny a náročnosti prípravy testu. Metódy opísané v tejto práci vo všeobecnosti znižujú čas analýzy, náklady na vybavenie a sú vhodné na rutinnú analýzu vzoriek. ELISA a PCR kity zabezpečujú ochranu a dôveru u spotrebiteľa pomocou presne vykonávaného monitorovania pre úspešné kontroly potravín.

Taktiež biosenzory poskytujú pomerne nový prístup k detekcii alergénnych zložiek v potravinách a sú zamerané aj na detekciu rýb. Tieto relatívne nové techniky sa začali uplatňovať len pred pár rokmi. Atraktívnym rysom tejto technológie je krátka doba analýzy a vysoký stupeň automatizácie. Medza stanoviteľnosti je porovnateľná s ELISA a je v rozmedzí od 1 až 10 mg. kg<sup>-1</sup>.

Ako nová metóda, ktorá sa začala využívať len v posledných rokoch sú metódy založené na nanotechnológii Lab – on – a – chipy. Čipy sú mimoriadnou nanotechnologickou senzáciou. Toto minilaboratórium má plochu iba štyri centimetre štvorcové, dá sa však doň umiestniť takmer neobmedzené množstvo nanoštruktúr. Táto technológia sa javí do budúcnosti ako mimoriadne zaujímavé riešenie pre laboratóriá, je však stále ešte veľmi drahá, a tak nie všetky potravinárske podniky si ju môžu zatiaľ dovoliť.

---

## 5 Záver

Alergia z potravín je jedna z najčastejších alergií, ktoré postihujú milióny ľudí na celom svete.

Skryté alergény v potravinách sú stále problémom, ktorý jednotliví výrobcovia musia riešiť a ktorý môže spôsobovať nepríjemnosti spotrebiteľom. Zistenie prítomnosti alergénu a uvedenie do pozornosti u spotrebiteľa na obale je hlavnou požiadavkou, ktorou sa musí riadiť každý výrobca. I keď sa výrobca snaží dodržiavať požiadavky legislatívy, čas od času nastanú chyby v označovaní, aj keď nie vždy zámerne. Preto by sa mali snažiť využívať metódy na detekciu týchto potenciálnych nebezpečenstiev. Detekcia rybacích alergénov pomocou prístrojových techník je stále ešte otvorenou problematikou.

Doteraz bola detekcia rybích alergénov v potravinách založená na použití séra pacienta. V súčasnosti sa vyvíjajú prístroje, ktorých hlavnou požiadavkou je práve špecifickosť na daný alergén. U rýb je nevýhoda rôznorodosť druhov rýb, a teda aj alergénov. Okrem parvalbumínu, môže byť nebezpečný parazit *Anisakis Simplex* a taktiež histamín, ktorého nadmerné množstvo môže vyvolať závažné komplikácie spotrebiteľa, až smrť. Stanovovanie rýb v potravinách býva častokrát náročné, kde komplikácie môžu spôsobovať i krížové reakcie. Metódy musia byť teda dostatočne citlivé, aby mohli zistiť konkrétne alergény v potravinách, ktoré spôsobujú alergické reakcie u citlivých jedincov.

V literatúre sa uvádza, že rýchlych analytických metód, určených na detekciu rybích alergénov je však stále nedostatok. I keď sa vyvíjajú i nové metódy, ako napríklad Biosenzory, či Lab – on – a - chipy, ich validácia zaostáva. Taktiež sa u nich vždy nájde nevýhoda, ktorú treba doriešiť, čo sa napríklad týka ceny.

Napriek tomu, že sú ryby dôležitou zložkou potravy človeka a zdrojom vitamínov, patria medzi najnebezpečnejšie alergénne potraviny. Preto vyhýbanie sa týmto alergénom a ochrana spotrebiteľa pred alergénnymi potravinami je veľmi dôležitá z hľadiska ochrany zdravia človeka.

---

## 6 Zoznam použitej literatúry

- ARILLA, C.M. – IBARROLA, I. – MARTÍNEZ, A. et al. 2008. An antibody-based Elisa for quantification of Ani s 1, a major allergen from *Aisakis simplex*. In *Parasitology*, roč 135, 2008, č. 6, s. 735 - 741
- ASENSIO, L. et al. PCR – based methodology for the autentication of grouper (*Epinephelus marginatus*) in commercial fish fillets. In *Food control*, roč 20, č. 7, s. 618 - 622
- BREŽNÁ, B. 2008. Metodické požiadavky na polymerázovú reťazovú reakciu pri detekcii alergénov v potravinách. In *Rutinní analýza nukleových kyselín molekulárně biologickými technikami*, Pardubice, 2008, s. 14
- CATANESE, G. 2010. A multiplex-PCR assay for the autentication of mackarel of the genus *Scomber* in processed fish products. In *Food chemistry*, roč. 122, 2010, č. 1, s. 319 – 326
- DOOLEY, J.J. et al. 2005. Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. In *Food control*, 2005, roč. 16, s. 601-607
- DORY, D. et al. 2007. Recognition of an extensive range of IgE-reactive proteins in cod extract. In *Allergy*, roč. 53, 2007, č. 1, s. 42 - 50
- ETIENNE, M. et al. 2000. Identification of Fish Species after cooking by SDS-PAGE and Urea IEF: A collaborative study. In *Food chemismy*, roč. 48, 2000, č. 7, s. 2653 - 2658
- FAESTE, K.CH. – PLASSEN, CH. 2008. Quantitative sandwich ELISA for determination of fis in foods. In *Journal of Immunological method*, roč 329, 2008, č 1-2, s. 45-55
- HAMADA, Y – NAGASHIMA, Y – SHIOMI, K. 2001. Identification of collagen as a new fish alergen. In *Department of food science and technology*, roč. 65, 2001, č. 2, s. 285 - 291
- HENGEL, J.A. 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. In *Anal bioanal chem*, roč 10, 2007, č 5, s. 111 – 118
- HILDEBRANDT, S., GARBER E.A.E. 2010. Effects of processing on detection and quantification of the parvalbumin gene in Atlantic salmon (*Salmo salar*). In *Food chemistry*, roč. 119, 2010, č. 1, s. 75 - 80

- 
- GALLAND, V.A. et al. 1998. Purification of a 41 kDa cod-allergenic protein. In *Journal of chromatography*, roč 706, 1998, č. 1, s. 63 – 70
- GIL, A.L. 2007. PCR-based method for fish and fishery product authentication. In *Trends in food science and technology*, 2007, č. 18, s. 558 - 566
- GREGORA, M. – ZÁKOSTELECKÁ, D. Jídelníček kojenců a malých dětí. 1.vyd. Holešovice : Grada Publishing, 2006. s 103. ISBN 80-2471-514-7.
- HIRD, H.J. et al. 2005. Development of a method for the quantification of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) in commercial products using real-time PCR. In *European food research and technology*, roč. 220, 2005, s. 633 - 637
- HRUBIŠKO, M. *Alergológia*, 1. vyd. Martin : Osveta, 2003. s 111 - 170. ISBN 80-8063-110-7
- KAYSEROVÁ, H. 2004. Potravinová alergia. In *Via practica*, roč. 2, 2004, s. 91
- KILIA, E. – et al. 2002. Authentication of Messalongi (Greece) fish roe using PCR-RFLP analysis of 16s rRNA mtDNA segment. In *Food control*, roč. 13, 2002, č. 3, s. 169 - 172
- KLIMO, F. Imunológia a alergológia vo všeobecnom lekárstve. In *Zborník z 13. vedeckej konferencie Slovenskej spoločnosti všeobecného lekárstva*. Martin: Osveta, 1987, s. 57.
- KUNOVÁ, V. *Zdravá výživa*. 2. vyd. Holešovice : Grada Publishing, 2004. s 103. ISBN 80-2470-736-5.
- LINDSROM, C.D. et al. 2003. Cloning of two distinct cDNAs encoding parvalbumin, the major allergen of Atlantic salmon (*Salmo salar*). In *Scandinavian journal of immunology*, roč. 44, 2003, č. 4, s. 335-344
- LOPAŠOVSKÝ, Ľ. – ZELENÁKOVÁ, L. – BOBKOVÁ, A. – GOLIAN, J. – ŽIDEK, R., a i. 2009. Alergény a bezpečnosť dehydrovaných potravín. In *Potravinárstvo*, roč. 3, 2009, č. 2, s. 50 - 55
- LOPATA, A.L. a i. 2005. Detection of Fish Antigens Aerosolized during Fish Processing Using Newly Developed Immunoassays. In *Arch Allergy Immunol* [online]. 2005, roč. 138, no 1, [cit. 2005-01-27]. Dostupné na internete: <<http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Doi=87354>>
- LO'PEZ, I., - PARDO, M.A. 2005. Application of relative quantification Taqman real-time polymerase chain reaction technology for the identification of *Thunnus*
-

---

*alalunga* and *Thunnus albacares*. In *Journal of agricultural and food chemistry*, roč. 53, 2005, č. 11, s. 4554 - 4560

LOCHMAN, I. – KOPŘIVA, F. – PANZNER, P. – WEIGL, E. 2004. Laboratorní diagnostika alergií. In *Alergie*, roč. 6, 2004, č.2, s. 15-16

LUPTÁKOVÁ, O. 2009. Hydina, vajcia, ryby a zverina v rýchlym výstražnom systéme v rokoch 2004 – 2008. In *Hygiena alimentorum XXX*, Košice : Univerzita veterinárneho lekárstva, 2009, s. 51

MIN, S. – CHENGZHU, L. – HONGWEI, G., et al. 2009. Detection of parvalbumin, individual fish allergen in foods by real – time PCR . In *Journal of AOAC International*, roč. jan – feb, 2009

PENGA, Y.F., et al. 2008. Development of an automated on-line pre-column derivatization procedure for sensitive determination of histamine in food with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. In *Journal of chromatography A*, roč. 1209, 2008, č. 1-2, s. 70-75

POMS, R.E. – ANKLAM, E. – KLEIN, C.L. 2004. Method for allergen analysis in food. In *Food additives and contaminants*, roč. 21, 2004, č. 1, s. 1-31

RAM, L.J – RAM, L.M. – BAIDOUN,F.F. 1996. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. In *Agricultural food chemistry*, roč. 44, č. 8, s. 2460 - 2467

QUINTEIRO, J. et al. 1998. Use of mtDNA polymerase chain reaction sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. In *Agricultural food chemistry* , roč. 46, 1998, č. 4, s. 1662-1669

QUINTEIRO, J. et al. 2001. Identification of Hake Species (*Merluccius* Genus) Using Sequencing and PCR–RFLP Analysis of Mitochondrial DNA Control Region Sequences. In *Agricultura food chemistry*, roč. 49, 2001, č. 11, s. 5108–5114

ULLRICH, S. P. et al. 2009. Commercialized rapid immunoanalytical tests for Determination of allergenic food proteins: an overview. In *Anal Bioanal Chem*, roč 10, 2009, s. 69 – 81



- 
- SOTELO, C.G. et al. 2003. Development of an identification and quantitation system for cod (*Gadus morhua*) using taqman assay. In *First joint trans- Atlantic fisheries technology conference*, roč. 39, 2005, č. 6, s. 195 - 198
- STEINMAN, H. 2008. Quantitative sandwich ELISA for the determination of fish in foods. In *Journal of immunological method*, roč. 329, 2008, č. 1-2, s. 45-55
- TAYLOR, V. A. et al. 2000. Detection and quantitation of raw fish aeroallergens from an open-air fish market. In *Journal of Allergy and clinical immunology*, roč. 105, 2000, č. 1, s. 166-169
- TROTT, A. et al. 2005. A multiplex PCR-method for use in real-time PCR for identification of fish fillets from grouper (*Epinephelus spp. and Mycteroperca spp*) and common substitute species. In *Journal of agricultural and food chemistry*, roč. 53, 2005, č. 6, s. 2039 - 2045
- TSAIA, H. Y. et al. 2005. Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. In: *Food kontrol*, roč. 16, 2005, č. 7, s. 579-585
- THIEN, D. et al. 2004. Characterization of parvalbumin, the major allergen in Alaska pollack, and comparison with codfish Allergen M. In *Molecular Immunology*, roč. 42, 2004, č. 3, s. 345 - 353
- VAN, D. T. et al. 2005. Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. In *Alleney clinic immunology*, roč. 116, 2005, č. 12, s. 20
- YAMADA, S. – NOLTE, H. – ZYCHLINSKY, E. 1999. Identification and characterization of allergens in two species of tuna fish. In *Annals of Alleney, asthma and immunology*, roč. 82, 1999, č. 4, s. 395 – 400

- 
- URL 1: Alergia – charakteristika [s.a.] [online] [cit. 2004-11-22 ]. Dostupné na internete: <<http://primar.sme.sk/c/4117310/alergia-charakteristika.html>>
- URL 2: Alergia na ryby [s.a.] [online]. Dostupné na internete: <<http://www.chudnutie-ako.sk/zdrava-vyziva-racionalna/potravinova-alergia/alergia-na-ryby/>>
- URL 3: Elisa [s.a.] [online] [cit. 2006-09-28]. Dostupné na internete: <<http://www.noack.cz/kategorie.asp?idk=246>>
- URL 4: Ryby a alergie 2004 [online] [cit. 2004-12-15]. Dostupné na internete: <<http://zdrava-vyziva.doktorka.cz/ryby-alergie/>>
- URL 5: Skřížená alergie- ryby [s.a.] [online]. Dostupné na internete: <<http://www.alergie.cz/sk/pre-odbornikov/skrizena-alergia/ryby/>>
- URL 6: V rybách číhá pro alergiky nebezpečí [s.a.] [online]. Dostupé na internete:  
<<http://www.ulekare.cz/clanek/v-rybach-ciha-pro-alergiky-nebezpeci-3654>>
- URL 7: Hidden Allergens in foods [s.a.] [online]. Dostupé na internete: <<http://www.allergyadvisor.com/hidden.htm>>
- URL 8: Polymerázová reťazová reakcia [s.a.] [online] [2003-2009]. Dostupné na internete: <<http://www.bioweb.genezis.eu/?cat=11&file=pcr>>
- URL 9: SureFood® Allergen Fish real-time PCR [s.a.] [online]. Dostupé na internete: marec 2008
- URL 10: Biosenzory a senzory [s.a.] [online]. Dostupé na internete: <<http://www.biorealis.sk/biosenzory-a-senzory>>
- URL 11: Analýza nukleových kyselín [s.a.] [online]. Dostupé na internete: <<http://www2.saske.sk/javorsky/pdf/Prednasky/P4%20Analyza%20nukleovych%20kyselin.pdf>>
- URL 12: SDS-PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) [s.a.] [online]. Dostupé na internete: <<http://www.bio.davidson.edu/COURSES/GENOMICS/method/SDSPAGE/SDSPAGE.html>>
- URL 13: Praktikum zo separačných metód [s.a.] [online]. Dostupé na internete: <[www.science.upjs.sk/files/5fb80b9b8a94417a6d13cd387fdaf3a6.rtf](http://www.science.upjs.sk/files/5fb80b9b8a94417a6d13cd387fdaf3a6.rtf)>
-

---

URL 14: Metódy separácie a určenia štruktúry organických zlúčenín [s.a.] [online]. Dostupé na internete:

<[http://motiv.fns.uniba.sk/clanky/chemia/Separacne\\_metody\\_v\\_organickej\\_chemii.doc](http://motiv.fns.uniba.sk/clanky/chemia/Separacne_metody_v_organickej_chemii.doc)>

URL 15: Prehľad molekulárno-genetických metód používaných pri detekcii DNA polymorfizmu [s.a.] [online]. Dostupé na internete:

<<http://kgpb.fapz.uniag.sk/molgen1.pdf>>

URL 16: Lab – on – a – chip [s.a.] [online]. Dostupé na internete:

<<http://www.hermeslab.sk/ponuka/pristroje-a-systemy/lab-on-a-chip.332.html>>