

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE**

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

3128714

**IDENTIFIKÁCIA A OPTIMALIZÁCIA ALERGÉNOV
ZELERU V POTRAVINÁCH METÓDOU REAL – TIME PCR**

Dizertačná práca

Študijný program:

Technológia potravín

Študijný odbor

6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych
produktov

Školiace pracovisko:

Katedra hygieny a bezpečnosti potravín

Školiteľ:

doc. Ing. Jozef Golian, Dr.

Nitra 2011

Ing. Andrea Jurčáková

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Ing. Andrea Jurčáková týmto prehlasujem, že som dizertačnú prácu na tému „Identifikácia a optimalizácia alergénov zeleru v potravinách metódou real-time PCR“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

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

Nitra, 30. júna 2011

.....

Pod'akovanie

Touto cestou si dovoľujem poďakovať vedúcemu dizertačnej práce **doc. Ing. Jozefovi Golianovi, Dr.** za cenné rady a pomoc pri vypracovaní dizertačnej práce, ako aj za usmerňovanie a vedenie počas celého doktorandského štúdia. Zároveň ďakujem **Ing. Radoslavovi Židekovi, PhD.,** za pomoc a cenné rady, ako i celému kolektívu katedry hygieny a bezpečnosti potravín, ktorí prispeli k vytvoreniu podmienok vhodných k realizácii mojej dizertačnej práce.

Abstrakt

Zeler (*Apium graveolens*) patrí k najbežnejším potravinám spôsobujúcim alergickú reakciu u dospelých. Je rozsiahle používaný ako zložka v potravinárskom priemysle. Tento fakt predstavuje značné riziko pre alergických jedincov, obzvlášť v prípade neúmyselnej konzumácie zeleru z dôvodu nesprávneho označovania. V záujme poskytnúť spotrebiteľom lepšiu informovanosť a ochraňovať zdravie tých, ktorí trpia potravinovými alergiami a/alebo intoleranciami, Európska únia implementovala legislatívny rámec, smernicu Európskeho Parlamentu a Rady 2003/89/EC, podľa ktorej je povinné označovanie pre 14 skupín zložiek so známym alergénnym potenciálom, medzi ktorými je i zeler a výrobky z neho. Počet alergických reakcií vyvolaných potravinami s život ohrozujúcimi syndrómami sa zvyšuje. Symptómy po požití alergénu sa pohybujú v rozpätí od zažívacích problémov, cez respiračné symptómy ako je rinitída a astma, kožné reakcie ako žihľavka a atopická dermatitída až po život ohrozujúcu anafylaxiu. Na základe vedeckého názoru EFSA bolo vykonaných niekoľko štúdií s cieľom stanoviť minimálne tolerovateľné dávky u pacientov citlivých na zeler, ktoré demonštrovali, že lokálne oropharyngeálne symptómy sú vyvolané pri nízkych dávkach zeleru (0,7-2,7 g), zatiaľ čo systémové symptómy sa objavujú len po prijatí dávok pohybujúcich sa od 7,5 g do 31 g. Prahové hodnoty boli podobné tiež pre varený zeler, zatiaľ čo zelerové korenie bolo schopné vyvolať systémové symptómy pri veľmi nízkych dávkach od 0,16 g do 5,85 g. Pre detekciu alergénov v potravinách bolo vyvinutých niekoľko metód na báze PCR. Týmto prezentujeme metódu pre detekciu zeleru v potravinách v podnikových laboratóriách prevádzkovateľov potravinárskeho priemyslu. Práca je zameraná na využitie real-time PCR a porovnanie použitia PCR farbív EvaGreen[®] Real-Time PCR a SYBRGreen[®] Real-Time PCR pre detekciu LOD zeleru a stanovenie jeho prítomnosti v koreninách. Pri real-time PCR s použitím farbiva SYBRGreen[®] Real-Time PCR detekčný limit pre zeler bol 1 %, zatiaľ čo pri použití farbiva EvaGreen[®] Real-Time bol detekčný limit 0,1 %. Pri použití klasickej PCR (end-point) sme dosiahli LOD 0,01%. Potravinársky priemysel, ako aj inštitúcie pre presadzovanie práva potrebujú spoľahlivé metódy k detegovaniu alergénnych potravín v záujme zabezpečiť vysokú úroveň bezpečnosti potravín a ochrany ľudského zdravia.

Kľúčové slová: zeler, potraviny, potravinová alergia, PCR, alergény, symptómy, detekčný limit.

Abstract

Celery (*Apium graveolens*) is one of the most common foods causing allergic reactions in adults. It is extensively used as an ingredient in the food industry. This fact constitutes a considerable risk for allergic individuals, especially in case of inadvertent consumption of celery due to improper labeling. In order to provide the consumers with better information and to protect the health of those suffering from food allergies and/or intolerances, a legislative framework has been implemented in the European Union, Directive of European parliament and Council 2003/89/EC, in accordance with this Directive a labeling is mandatory for 14 groups of ingredients with known allergenic potential, amongst others, celery and products thereof. The number of food-allergen-induced life-threatening syndromes is increasing. Symptoms after ingestion of the allergens range from digestive disorders, respiratory symptoms such as rhinitis and asthma, skin reactions such as urticaria and atopic dermatitis to life-threatening anaphylaxis. Based on the scientific opinion of EFSA a few studies were performed to determine the minimum tolerable dose in celery sensitised patients, which demonstrated that local oropharyngeal symptoms are elicited by low doses of celery (0.7-2.7 g), while systemic symptoms arose only after ingestion of doses ranging from 7,5 g to 31 g. Threshold doses were similar also for cooked celery, while celery spice was able to induce systemic symptoms at very low doses of 0.16 g – 5,85 g. Several PCR-based methods have been developed for the detection of allergens in food. Hereby we present accessible method for detection of celery in food operator's laboratory, when detection limit 0.01 % for celery was determined. The next part of assay is aimed at real-time PCR and comparison of using PCR dyes EvaGreen[®] Real-Time PCR and SYBRGreen[®] Real-Time PCR for detection of LOD for celery and determination of celery presence in spices. When using real-time PCR and PCR dye SYBRGreen[®] Real-Time PCR detection limit for celery was 1 %, whilst using PCR dye EvaGreen[®] Real-Time detection limit was 0.1 %. When using conventional PCR (end-point) we have achieved LOD of 0.01%. Both industry and law-enforcement institutions need reliable methods to detect allergenic foods at relevant levels in complex food products in the interest to ensure high level of food safety and to protect human health.

Key words: celery, food, food allergy, PCR, allergens, symptoms, detection limit.

Obsah

OBSAH	6
POUŽITÉ OZNAČENIE	8
ÚVOD	10
1 PREHĽAD LITERATÚRY	13
1.1 Atopia a alergia.....	13
1.2 Označovanie alergénov.....	17
1.3 Potravinová intolerancia.....	17
1.4 Prevalencia potravinovej alergie.....	23
1.5 Potravinová alergia.....	26
1.6 Klinické príznaky potravinovej alergie.....	27
1.7 Alergické ochorenia.....	28
1.8 Anafylaxia.....	30
1.9 Najznámejšie alergény živočíšneho pôvodu.....	32
1.10 Najznámejšie alergény rastlinného pôvodu.....	35
1.11 Skrížená reaktivita potravinových alergénov.....	41
1.12 Diagnostika alergických ochorení.....	45
1.13 Alergia na zeler (<i>Apium graveolens</i> L.).....	48
1.13.1 Botanická charakteristika – zeler.....	48
1.13.2 História pestovania zeleru a jeho využitie v potravinárstve.....	49
1.14 Alergénne vlastnosti zeleru a klinické prejavy alergie na zeler.....	50
1.15 Metodické postupy vhodné k detekcii potravinových alergénov.....	52
1.15.1 Imunoelektroforetické metódy.....	52
1.15.2 Imunologické metódy.....	54
1.15.3 Polymerázová reťazová reakcia – DNA metódy.....	55
1.16 Označovanie alergénov v potravinách.....	58
1.17 Prevencia a liečba alergických ochorení.....	67
2 CIEĽ PRÁCE	70
3 MATERIÁL A METODIKA	71

3.1	Analyzovaný materiál.....	71
3.2	Experimentálny materiál a organizácia experimentov	75
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	84
5	NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV.....	102
	ZÁVER	104
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	106

Použité označenie

AKD	alergická kontaktná dermatitída
APT	epikutánný test s aeroalergénmi
Bp	bázové páry
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleozid trifosfáty
DBPCFC	dvojito zaslepený placebom kontrolovaný orálny expozičný test
EAACI	Európska akadémia pre alergológiu a klinickú imunológiu
EAST	enzýmový-alergosorbent test
ECU	európska menová jednotka
EFSA	Európsky úrad pre bezpečnosť potravín
ELISA	enzýmová imunosorbentová analýza
EvaGreen[®]	interkalačné farbivo
EÚ	Európska únia
FAAN	Sieť pre potravinovú alergiu a anafylaxiu
FAO	Svetová organizácia pre výživu a poľnohospodárstvo
FALCPA	zákon o označovaní potravinových alergénov a ochrane spotrebiteľa (angl. Food Allergen Labelling and Consumer Protection Act)
FDA	Agentúra pre potraviny a liečivá
g	gram
GMO	geneticky modifikované organizmy
IgG, IgM, IgD, IgA, IgE	imunoglobulíny (protilátky)
mM	milimól
mg	miligram
MgCl₂	chlorid horečnatý
mm	milimeter
Ng	nanogram (10 ⁻⁹ kg)
OAS	orálny alergický syndróm
OPT	orálny provokačný test

PCR	polymerázová reťazová reakcia
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrácie vodíkových iónov
PK SR	Potravinový kódex SR
Ppm	„parts-per-million“ (10^{-6} kg)
R^2	koeficient determinácie
SO₂	oxid siričitý
SPT	vpichový test, prick - test
SYBRGreen®	interkalačné farbivo
ŠVPS SR	Štátna veterinárna a potravinová správa SR
ŠVPÚ	Štátny veterinárny a potravinový ústav
TaqMan	sekvenčne špecifická próba (sonda)
T_m	teplota topenia produktu PCR reakcie
UCB	Inštitút UCB (franc. Union Clinique Belge)
USA	Spojené štáty americké
V	volt
μl	mikroliter (10^{-6} l)
μg	mikrogram (10^{-6} kg)

Úvod

Početné štúdie poukazujú na dramatický vzostup alergických ochorení v posledných dekádach. Počet alergických chorôb má výrazne stúpajúcu tendenciu, odhaduje sa, že v priemyselne vyspelých štátoch sa počet postihnutých osôb ročne zvyšuje o 5 %. Rovnako epidemiologické vyšetrenia dokazujú rýchly nárast alergických ochorení. Dôležitú úlohu zohrávajú najrôznejšie faktory vrátane komplexnej interakcie so životným prostredím, napr. kvalita bývania, spôsob stravovania, životné prostredie, meniace sa v závislosti od rozvoja priemyslu a chemického spracovania surovín. Narastajúci výskyt alergických ochorení má negatívne sociálne a ekonomické dopady a vyžaduje si systematický prístup pri tvorbe preventívnych stratégií, vo vede a výskume, ako aj spoluprácu na úrovni národných a medzinárodných organizácií.

Podľa Európskej Bielej knihy alergie patria alergické ochorenia medzi celkovo najčastejšie chronické ochorenia, ktoré postihujú 15 – 30 % obyvateľstva Európskej únie. Podľa údajov Centra pre kontrolu a prevenciu ochorení v Spojených štátoch amerických, potravinové alergie postihujú okolo 2 % dospelých a od 4 – 8 % detí a počet mladých ľudí s potravinovými alergiami sa za posledné desaťročie zvýšil. Táto skutočnosť má vplyv ako na potravinársky priemysel, tak na spotrebiteľa, ktorý má právo dozvedieť sa informácie o zložení a vlastnostiach výrobku čo najviac na základe deklarovaného zloženia na jeho obale. Výskyt alergií sa môže medzi krajinami líšiť, čo je pravdepodobne odrazom spotreby potravín a rôznych stravovacích zvyklostí.

Potravinová alergia je vo väčšine prípadov okamžitá a výrazná reakcia na potravinu, vyvolávajú ju potravinové alergény väčšinou prostredníctvom špecifických IgE protilátok. Sú to reakcie včasnej precitlivenosti prejavujúce sa rôznymi gastrointestinálnymi, kožnými, respiračnými alebo generalizovanými syndrómami, ktoré môžu vyústiť do anafylaxie a anafylaktického šoku, ktorý môže byť smrteľný. Závažnosť alergických reakcií sa zvyšuje u atopických jedincov s vrodenou genetickou predispozíciou reagovať už na veľmi nízke dávky alergénov tvorbou špecifických IgE protilátok. Ďalším významným faktorom, ktorý ovplyvňuje výskyt alergických ochorení je tzv. skrížená reaktivita, kedy alergický jedinec reaguje na obsah rovnakého alebo biochemicky veľmi príbuzného (homológneho) antigénu väčšinou bielkovinového charakteru. Častá je skrížená reakcia medzi plodmi alebo inými časťami (koreňmi, vňaťou, ...) príbuzných rastlín a peľom príbuzných, ale aj nepríbuzných rastlín.

Uvedené skutočnosti viedli k právnej úprave potravinového práva Európskej únie a určení povinnosti prevádzkovateľov potravinárskeho priemyslu označovať alergény na obale potravín. Smernica Európskeho Parlamentu a Rady 2003/89/ES, ktorou sa mení a dopĺňa smernica 2000/13/ES o označovaní zložiek prítomných v potravinách s účinnosťou od 25. novembra 2003, novelizuje smernicu 2000/13/ES, a mala by zaručiť, že sa osoby trpiace potravinovou alergiou budú môcť chrániť pred konzumáciou alergénov v potravinách. Podľa tejto 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, musí byť vyznačená na etikete s jednoznačným odkazom na názov tejto zložky. Táto novela bola prijatá so zreteľom na skutočnosti, že určité zložky alebo iné látky používané pri výrobe potravín a prítomné v potravinách spôsobujú u spotrebiteľov alergie alebo prejavy neznášanlivosti, pričom niektoré z týchto alergií alebo prejavov neznášanlivosti predstavujú ohrozenie zdravia dotknutých osôb. Smernica stanovila povinnosť označovať na etikete alergénne zložky uvedené v prílohe III.a tejto smernice, pričom medzi ne patria: obilniny obsahujúce lepok (t.j. pšenica, raž, jačmeň, ovos, špalda, kamut alebo iné hybridné odrody) a výrobky z nich, kôrovce a výrobky z nich, vajcia a výrobky z nich, ryby a výrobky z nich, arašidy a výrobky z nich, sójové bôby a výrobky z nich, mlieko a výrobky z neho (vrátane laktózy), orechy t.j. mandle (*Amygdalus communis L.*), lieskové orechy (*Corylus avellana*), vlašské orechy (*Juglans regia*), kešu (*Anacardium occidentale*), pekanové orechy (*Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch*), para orechy (*Bertholletia excelsa*), pistácie (*Pistacia vera*), makadamové orechy a queenslandské orechy (*Macadamia ternifolia*) a výrobky z nich, zeler a výrobky z neho, horčica a výrobky z nej, sezamové semená a výrobky z nich, oxid siričitý a siričitany v koncentráciách vyšších ako 10 mg/kg alebo 10 mg/liter vyjadrené ako SO₂, vlčí bôb a výrobky z neho, mäkkýše a výrobky z nich.

Uvedená smernica bola aproximovaná i do potravinového práva Slovenskej republiky, konkrétne do Potravinového kódexu SR (Výnos Ministerstva pôdohospodárstva SR a Ministerstva zdravotníctva SR z 28. apríla 2004 č. 1187/2004 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín), s účinnosťou povinného označovania alergénnych zložiek od 25. novembra 2004.

Z uvedeného vyplýva, že na základe analýzy rizika a epidemiologických štúdií, názoru Vedeckého výboru pre potraviny a Vedeckého panelu Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA) pre dietetické produkty, výživu a alergie, bol zeler a výrobky z neho v rámci Európskeho spoločenstva zaradený medzi povinne označované alergénne zložky v potravinách. Tento fakt zohľadňuje vyššie spomenutá právna úprava Európskej únie, ale nie je zohľadnený v práve tretích krajín, kedy v krajinách ako sú Spojené štáty americké, Kanada, Čína, Thajsko, India, a z ktorých sa realizuje dovoz potravín na územie SR, nie je povinnosť označovať zeler ako alergén na spotrebiteľskom obale. Alergia na koreň zeleru pritom patrí k najviac frekventovaným peľovým potravinovým alergiám v niektorých európskych krajinách ako Švajčiarsko, Francúzsko alebo Nemecko.

Zeler voňavý (*Apium graveolens* L.) z hľadiska botanickej charakteristiky patrí do čeľade mrkvovité (*Apiaceae*, syn.: *Daucaceae*, *Umbelliferae*). Je súčasťou šalátov, polievok, bujónov, koreniacich zmesí, sušených dehydrovaných pokrmov, omáčok a je častou príčinou potravinových alergických reakcií. Najčastejšou formou alergie po koreňovej zelenine je orálny alergický syndróm po konzumácii čerstvých koreňov, sú však možné všetky ostatné prejavy precitlivenosti (urtikária, angioedém, rinitída, astma, anafylaxia). Závažné prejavy môžu najmä u polinotikov vzniknúť pri šúpaní, resp. strúhaní koreňov. Pri priamom kontakte kože s čerstvou zeleninou vzniká u vnímavých jedincov kontaktná dermatitída. Častá je skrížená reaktivita zeleru s príbuznými druhmi čeľade mrkvovité ako rasca lúčna (*Carum carvi*), bedrovník anízový – aníz (*Pimpinella anisum*), fenikel obyčajný (*Foeniculum vulgare*), koriander siaty (*Coriandrum sativum*), kôpor voňavý (*Anethum graveolens*, syn.: *Peucedanum graveolens*), kumín biely nazývaný aj rasca rímska (*Cuminum cyminum*), ligurček lekársky (*Levisticum officinale*), ktoré sa používajú ako koreniny samostatne alebo v zmesiach korenín. Z polinózných rastlín je častá skrížená reaktivita s peľom brezy (čeľaď Brezovité – *Betulaceae*) a paliny (čeľaď Astrovité – *Asteraceae*).

Cieľom dizertačnej práce bolo overiť vhodnosť a optimálnosť metódy real-time PCR pre detekciu zeleru ako potravinového alergénu a aplikáciou metódy zhodnotiť uplatňovanie práva EÚ pre označovanie alergénov vo vzorkách potravín pochádzajúcich z tretích krajín.

1 Prehľad literatúry

1.1 Atopia a alergia

Atopia je dedične podmienená abnormálna precitlivosť včasného typu (anafylaxia) na určitý alergén alebo skupinu alergénov. Jej podstatou je geneticky podmienená zvýšená protilátková odpoveď v triede IgE, čo má za následok, že takýto jedinec (atopik) odpovedá uvoľnením mediátorov anafylaxie už na veľmi nízke dávky alergénu, tvorba špecifických IgE pretrváva abnormálne dlho aj bez ďalšej stimulácie alergénom a zvyčajne sa zvyšuje i hladina celkových IgE (**Ferenčík et al., 2006**).

Termín atopia zaviedol v roku 1923 Coca a vychádza z gréckeho slova atopos – nezvyklý. Na rozdiel od anafylaxie vyskytuje sa iba u geneticky predisponovaných jednotlivcov. Genetická predispozícia k atopii vynikne najmä pri sledovaní rodín. Je známe, že ak obaja rodičia sú alergickí, existuje 50 % pravdepodobnosť, že ich deti budú alergické tiež, ak je alergický len jeden z rodičov, táto pravdepodobnosť klesne na 30 % (**Buc, 2005**).

Európska biela kniha alergie uvádza, že najpresvedčivejšie dôkazy o úlohe genetických vplyvov na vývoj atopie poskytuje sledovanie dvojčiat, ktoré dokazujú, že až 50 % odchýlok v hodnotách IgE protilátok možno pripočítať genetickým vplyvom. Všetko nasvedčuje tomu, že metódy molekulárnej biológie by nám mali v budúcnosti pomôcť spoznať základy rodinných dedičných väzieb, ale aj využiť niektoré biologické indikátory (markery) alergie a atopie. Doposiaľ sú genetické štúdie založené na vybraných skupinách pacientov a alergických rodinách s výskytom určitých znakov (fenotypov) - napríklad na pozorovateľných zmenách štruktúry a funkcie organizmu. Ďalším krokom bude stanovenie výskytu molekulárne definovaných genetických znakov a ich vplyvu na ochorenie. To by mohlo viesť k novým zaujímavým možnostiam diagnostiky a liečby (**www.alergie.cz**).

Najcharakteristickejším typom alergie je atopia. Atopia je vrodený sklon odpovedať na bežné, prirodzene sa vyskytujúce, vdychované alebo požívané antigény (alergény) kontinuálnou tvorbou špecifických protilátok triedy IgE. Alergény, ktoré vyvolávajú atopický typ reakcie pochádzajú zvyčajne z organických častíc nachádzajúcich sa vo vzduchu. Sú to najmä peľ rastlín, spóry húb, odpad z kože, srst' povrchu zvierat

a hmyzu a potraviny. Alergické prejavy sa môžu vyskytnúť v ktorejkoľvek časti tela (Nyulassy, 2003).

Alergén je taký antigén, ktorý u väčšiny ľudí buď vôbec nevyvolá imunitnú odpoveď, alebo vzniknú pri nej protilátky triedy IgG, prípadne IgM. U geneticky predisponovaných ľudí však pri odpovedi naň vznikajú protilátky triedy IgE, ktoré potom vyvolávajú alergické choroby, ako je napr. atopická priedušková astma, žihľavka, senná nádcha alebo potravinová alergia. Takáto genetická predispozícia sa označuje aj ako atopia a choroby, na ktorých sa zúčastňujú protilátky IgE, ako atopické choroby (Ferenčík et al., 2004).

Už Hippocrates (460–370 BC) poznal kožné a gastrointestinálne prejavy alergie na kravské mlieko, Galén (131–210 A.D.) píše o alergii na kozie mlieko. V 17. a 18. storočí sa množia pozorovania o príčine potravinových alergénov pri vzniku astmy (ryby) a dermatitídy (vajce, mušle). V roku 1656 P. Borel zaviedol vo Francúzsku kožný test s vajcovým bielkom. C. Richet publikoval v roku 1919 prácu: „Food Anaphylaxis“, kde zhrnul všetky známe poznatky o potravinovej alergii (Kayserová, 2004).

Základné objavy alergie boli vykonané v rokoch 1900 až 1905. V roku 1901 sa lekári Richet a Portier zúčastnili na výprave na jachte monackého kniežaťa. Všimli si však aj „nižšiu spoločnosť“ a tak zaznamenali kožné vyrážky námorníkov spôsobené stykom s morskými sasankami. Po návrate študovali vplyv výťažkov z rôznych morských živočíchov na psoch: pri opakovaných injekciách dochádzalo k prudkej celkovej reakcii, ktorú nazvali anafylaktickou, t.j. nežiaducou, paradoxnou, škodlivou. V tej istej dobe pozorovali von Pirquet a Schick nežiaducu reaktivitu niektorých detí, liečených opakovane protizáškrtovým sérom: nazvali ju alergiou (Nouza, 1981).

Alergény sú antigénne látky schopné navodiť precitlivosť organizmu, predovšetkým u geneticky predisponovaných jedincov. V užšom slova zmysle 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, IV. typ imunitnej odpovede. Alergény sú látky prevažne proteínového alebo glykoproteínového charakteru s molekulovou hmotnosťou zvyčajne 5 – 100 kD. Podľa klinického významu sa alergény z alergénového zdroja delia na hlavné (major, reaguje > 50 % precitlivených) a vedľajšie (minor, reaguje < 50 % precitlivených) (Hrubiško et al., 2003).

Prípady alergie, ako je astma alebo ekzém, opísal už Hippokrates v 5. storočí pred n.l.. Slovo „alergia“ prvýkrát použil viedenský pediater Clemens von Pirquet r. 1906. Opísal ním prípady niektorých detí, ktoré vtedy očkovali proti záškrtu. Väčšina detí znášala očkovanie dobre, ale niekoľko z nich ochorelo a zomrelo. Vtedy von Pirquet vyslovil predpoklad, že prvá injekcia očkovacej látky (bol to antitoxín, čiže protilátka proti záškrtovému toxínu) vyvolala u týchto detí zmenený stav, ktorý opísal slovom „alergia“. Keďže deti s touto „alergiou“ dostali druhú injekciu, vyvolala táto u nich nepriaznivú reakciu (**Ferenčík et al., 2004**).

Ferenčík et al. (2006) uvádza, že termín alergia znamená „inú reakciu“ a bol zavedený r. 1906 Clemensom von Pirquetom. Definuje alergiu na potraviny – vyvolávajú ju potravinové alergény väčšinou prostredníctvom špecifických IgE. Sú to reakcie včasnej precitlivenosti prejavujúce sa rôznymi gastrointestinálnymi, kožnými, respiračnými alebo generalizovanými syndrómami, ktoré môžu vyústiť do anafylaxie. Potravinová alergia postihuje 6 – 8 % detí a 1 – 2 % dospelých. Prevažná väčšina alergických reakcií na potraviny sa vyskytuje už v prvom roku života. Od potravinovej alergie treba odlíšiť potravinovú intoleranciu, na vzniku ktorej sa nezúčastňujú imunitné mechanizmy.

Alergia je jav, ktorý výrazne ovplyvňuje ľudské zdravie ako aj celkovú dĺžku života jedinca. Prevažná časť populácie znáša rôzne druhy potravín bez akýchkoľvek zdravotných problémov. U malého percenta ľudí určité druhy potravín môžu vyvolať negatívne reakcie, v rozmedzí od ľahkého začervenania kože až po fatálne, život ohrozujúce alergické reakcie (**Coca, 2001; Rimárová, Lovayová, 2007**).

Potravinová alergia je forma potravinovej intolerancie, ktorá sa prejavuje abnormálnou imunologickou reakciou na špecifickú potravinu alebo prísadu, ktorá nie je fyziologickej povahy (**Rujner, Cichanska, 2006**).

Potravinová alergia vzniká najmä u atopikov, teda u osôb s vrodenuou schopnosťou alergicky reagovať. Odhaduje sa, že túto „schopnosť“ má až 50 % populácie (**Kayserová, 1999**).

Podľa **Gamlinovej (2003)** vďaka multigenetickej dedičnosti sa dá predpovedať, u koho sa alergia vyvinie. Genetické riziká prenášané z rodičov na potomkov sa sčítavajú, takže ak sú obaja rodičia alergici alebo pochádzajú z atopických rodín, riziko vzniku alergie u dieťaťa je omnoho vyššie, ako keď je atopický len jeden z rodičov. Súčasné názory na túto problematiku sa rôznia a rovnako sa líšia aj výsledky jednotlivých štúdií.

Ak je jeden z rodičov atopik, riziko, že ním bude aj dieťa, kolíše medzi 20 % až 58 %, no ak sú atopikmi obaja rodičia, pohybuje sa riziko pre dieťa medzi 50 % až 80 % alebo je dokonca ešte vyššie.

Prakticky štvrtina ľudí na svete trpí nejakou formou intolerancie, prevalencia a závažnosť ochorení stále narastá. Táto skutočnosť má vplyv ako na potravinársky priemysel, tak na spotrebiteľa, ktorý má právo dozvedieť sa o výrobku čo najviac na základe deklarovaného zloženia na jeho obale (**Woods et al., 2002**).

Kayserová (2004) uvádza rôzne typy nežiaducich potravinových reakcií. Potravinová alergia je len istou (menšou) časťou väčšej skupiny klinických prejavov, ktoré nazývame nežiaduce potravinové reakcie. Nežiaduca potravinová reakcia je akákoľvek nepríjemná reakcia po požití potravy. Takáto reakcia je toxická alebo netoxická. Toxické reakcie vyvolávajú toxíny baktérií (stafylokokový, salmonelový enterotoxín), alebo vysoký obsah biogénnych amínov (napr. tzv. skombroidový syndróm po požití chybné skladovaných rýb). Netoxické reakcie spôsobujú imunitné, alebo neimunitné mechanizmy (potravinová alergia – hypersenzitívnosť, alebo intolerancia). Potravinová alergia (hypersenzitívnosť) je dôsledok abnormálnej imunologickej odpovede jedinca po požití potravy (IgE: I. typ, non-IgE: II. a IV. typ imunopatologickej reakcie). Potravinová intolerancia je abnormálna neimunologická reakcia po požití potravy v dôsledku enzymatickej poruchy: napr. intolerancia kravského mlieka pri laktázovej deficiencii, alebo farmakologickej reakcie na chemické produkty v potrave.

Nyulassy (2003) uvádza, že napr. v Plzeňskom regióne prevalencia alergikov v roku 1974 bola 4,5 %, dnes je to na Slovensku vyše 30 %. Pred 30 rokmi sa imunodeficientné stavy diagnostikovali zriedkavo, ako vrodené poruchy imunity detí, dnes sa identifikujú ako sekundárne u 20 % populácie. V USA je alergiou postihnutých okolo 40 – 50 miliónov populácie. Alergickou rinitídou trpí 9,3 % populácie. Pracovná neschopnosť len z titulu tejto diagnózy predstavuje ročnú stratu okolo 4 miliárd amerických dolárov. Na bronchiálnu astmu trpelo v r. 1994 až 14 miliónov ľudí, čo je dvojnásobok počtu z roku 1980. Ročné náklady na liečbu týchto pacientov predstavujú 6,2 miliárd amerických dolárov. Päťtisíc týchto pacientov ročne zomiera.

Európska biela kniha alergie (**www.alergie.cz**) uvádza, že alergické ochorenia sa najčastejšie prejavujú v podobe nádchy, astmy, atopickej dermatitídy a ďalších kožných ťažkostí, ale tiež ako život ohrozujúci anafylaktický šok. Vo vyspelých krajinách patria

alergie medzi celkovo najčastejšie chronické ochorenia, ktoré postihujú 15 – 30 % obyvateľstva.

1.2 Označovanie alergénov

Dlhoročné úsilie vyústilo do dnes všeobecne akceptovaného názvoslovia alergénov, ktoré vychádza z taxonomickej príslušnosti zdroja, respektíve z binominálneho názvoslovia používaného pri rastlinách, živočíchoch a mikroorganizmoch. Termín alergén označuje konkrétnu molekulu, napr. Bet v 1, a nie peľ brezy, z ktorého táto molekula pochádza. Podľa komisie expertov WHO a IUIS (Medzinárodná únia imunologických spoločností) treba každý alergén najprv charakterizovať imunochemicky, sekvenčne, konformačne a biologicky a až potom ho zaradiť do systému názvoslovia (**Hrubíško et al., 2003**).

Nomenklatúra alergénov sa zakladá na ich systémovom označení. V tomto označení sa uvádzajú prvé tri písmená (prvé je veľké) z názvu biologického rodu, z ktorého pochádza alergén, potom je v označení medzera a nasleduje prvé písmeno druhu, zase medzera a poradové číslo alergénu. Napr. prvý alergén z brezy, ktorej latinský názov je *Betula pendula*, má označenie: Bet p 1 a jeho prvý izoalergén: Bet p. 1.01, druhý izoalergén: Bet p 1.02 atď. (**Ferenčík et al., 2004**).

1.3 Potravinová intolerancia

Od potravinovej alergie treba odlíšiť potravinovú intoleranciu, na vzniku ktorej sa nezúčastňujú imunitné mechanizmy (**Ferenčík et al., 2006**).

Falošná potravinová alergia (pseudoalergia) – klinické prejavy ako pri pravej potravinovej alergii sú vyvolané vysokým obsahom biogénnych amínov (histamín, kadaverín, katecholamíny, putrescín, tyramín). Abnormálne uvoľnenie mediátorov zo žírnych buniek môžu spôsobiť aj rastlinné lektíny, niektoré produkty plesní, peptóny a iné látky. Potravinové aditíva môžu interferovať s autonómnym nervovým systémom, resp. s jeho pôsobkami. Psychogénna intolerancia potravín (vracanie, ale i kožné prejavy) nie je podložená imunitným mechanizmom, v závažných prejavoch môže vyjadriť spojenie nervového a imunitného systému (**Kayserová, 2004**).

Klasickú alergickú reakciu spôsobuje spustenie imunologických mechanizmov po konzumácii potravinového alergénu. Táto sa prejavuje rozličnými klinickými príznakmi. Podobné klinické príznaky môžu vzniknúť po konzumácii rôznych jedál inými mechanizmami – nealergickými (**Pružinec, 2002**).

Príznaky, ktoré sa veľmi podobajú potravinovej alergii, vyvolávajú dve rôzne choroby: nepravá potravinová alergia a otrava histamínom. Na nepravej potravinovej alergii sa zúčastňujú žírne bunky, ale bez alergickej reakcie. Jej príčinou sú látky obsiahnuté v potrave, ktoré môžu priamo ovplyvniť žírne bunky. Niektoré z týchto látok sa viažu na receptory pre IgE na povrchu žírnych buniek, pričom spôsobujú ich degranuláciu. Pod pojmom degranulácie sa rozumie uvoľňovanie histamínu zo žírnych buniek pri ich aktivácii, keď nastáva vyprázdnenie bunkových zŕn so zásobami histamínu. Príznaky nepravej potravinovej alergie sú nerozoznatel'né od skutočnej alergie na potraviny, pretože oba prejavy spočívajú na rovnakom princípe – zo žírnych buniek sa uvoľňuje histamín. Kožné testy sú zvyčajne pozitívne, nedokážu však odlišiť nepravú alergiu od skutočnej alergie vyvolanej protilátkami IgE. Tieto dve reakcie môže rozlíšiť špeciálne krvné vyšetrenie (**Gamlinová, 2003**).

Mnohé potraviny obsahujú tzv. „vazoaktívne amíny“ – (histamín, tyramín, serotonín, fenyletylamín, osamylamín), ktoré u citlivejších jedincov alebo po konzumácii väčšieho množstva inkriminovaného jedla, môžu svojim pôsobením spúšťať reakciu. Táto je vlastne „druhou časťou“ reakcie alergickej – preto aj podobné klinické prejavy. Amíny majú priamy i nepriamy účinok najmä na cievny systém, takže najbežnejšími prejavmi bývajú bolesti hlavy, brucha, hnačky, sčervenanie tváre. Niektoré potraviny môžu najmä pri nesprávnom skladovaní obsahovať toxické látky, ktoré produkuje pleseň – aflatoxín (**Pružinec, 2002**).

Rozdelenie nepriaznivých reakcií na potraviny na potravinovú alergiu a potravinovú neznášanlivosť je dôležité kvôli odlišnej liečbe. Príznaky sú podobné, aj keď pri potravinovej intolerancii sa okrem príznakov typických pre potravinovú alergiu môže objaviť aj celková únava a nadmerná spavosť, migréna, depresia, syndróm „dráždivého čreva“ (zápcha alebo hnačka, bolesti brucha, zvýšená plynatosť čriev) a zhoršenie niektorých chorôb (**Ferenčík et al., 2004**).

Potravinová intolerancia je dôsledkom abnormálnej neimunologickej reakcie po požití potravy. Príčinou uvedených reakcií sú väčšinou nízkomolekulárne látky odlišné

od proteínov, napr. toxíny prirodzene sa vyskytujúce v potravinách, mikrobiálne, alebo chemické kontaminanty potravín. Ďalej sú to metabolické poruchy (napr. nedostatok niektorých enzýmov, ako je laktáza) a idiosynkratické reakcie (reakcie na lieky). Pri týchto reakciách sa tiež uvoľní histamín a iné biogénne amíny, nie však pri reakcii IgE s alergénom, ale inými spôsobmi a vzniknú príznaky podobné až identické s alergickými stavmi **(Kayserová, 1999)**.

Treba si uvedomiť, že samotná intolerancia laktózy nie je choroba, pri zisťovaní tolerancie jednotlivých výrobkov u dieťaťa sa maximálne jednorazovo objavia subjektívne ťažkosti. Od intolerancie laktózy však treba odlíšiť alergiu na mlieko. Alergia vzniká na bielkovinu kravského mlieka a nie na mliečny cukor. V tomto prípade, ak dieťa má naozaj zistenú alergiu, akákoľvek konzumácia mlieka môže spôsobiť ťažkosti, u niektorých aj so závažnými následkami. Mliečne výrobky s obsahom laktózy pod 2 % sú u väčšiny detí s laktózovou toleranciou dobre tolerované **(Murray, 1998)**.

Celiakálna choroba je autoimunitné ochorenie spôsobené gluténovými bielkovinami prítomnými v pšenici, jačmeni a raži. Celiakálna choroba bola v minulosti považovaná za zriedkavé ochorenie včasného detského veku. V súčasnosti je celiakia diagnostikovaná stále častejšie a je považovaná za bežné ochorenie, prítomné v každom veku s rôznymi klinickými prejavmi a komplikáciami. Aktívna celiakálna choroba je charakterizovaná intestinálnymi a extraintestinálnymi klinickými prejavmi **(Krajčírová, 2007)**.

Celiakálna choroba je chronické, celoživotné črevné ochorenie, charakterizované trvalou neznášanlivosťou (intoleranciou) lepku. Najvyššiu toxicitu má gliadín, potom sekalín a avenín **(Rujner, Cichanska, 2006)**.

Michalík et al. (2001) uvádzajú, že celiakálne ochorenie sa môže rozvinúť iba vtedy, ak dôjde k narušeniu homeostázy i vrátane negatívneho pôsobenia environmentálnych faktorov, ktoré môžu uvoľňovať zápalové mediátory. Z uvedeného je zrejmé, že príčina ochorenia je ďaleko zložitejšia a je podmienená komplexom faktorov a vzájomnej interakcie genetických vlastností jedinca, chemickou štruktúrou bielkovín, biochemizmom procesov trávenia lepkových bielkovín, ale aj faktorov prostredia.

Celiakálne ochorenie je charakteristické poškodením štruktúry malej intestinálnej sliznice tenkého čreva, ktoré spôsobuje disfunkciu buniek sliznice. Táto disfunkcia vedúca k malabsorbcii je príčinnne spájaná so zavádzaním potravy obsahujúcej prolamíny obilného

zrna ako sú gliadíny pšenice, sekalíny raže, hordeíny jačmeňa, aveíny ovsa a intolerancie k nim (**Murray, 1999**).

Celiakia je autoimunitná choroba, je výsledkom imunitnej reakcie na rôzne proteíny obilnín, najčastejšie na pšeničný gliadín. Klinicky sa môže prejavíť už v ranom detstve, keď sa dieťa dostane do kontaktu s pšeničnou stravou. Môže sa však manifestovať aj v puberte, ba dokonca až v dospelosti. Celkovo však približne polovica pacientov vyvinie chorobu v detskom veku. Pomer žien k mužom je okolo 2:1, dievčat k chlapcom 1:1. Prevalencia v Európe sa udáva 1:1 500, s najväčším výskytom v Írsku (1:150). Novšie údaje založené na skriningových sérologických metódach však udávajú, že prevalencia bude väčšia, 1:100 až 1:300. V iných krajinách sa vyskytuje ešte tam, kam emigrovali Európania, t.j. v Severnej Amerike a Austrálii, ďalej v severozápadnej Indii, veľmi zriedkavá je u Číňanov a Japoncov. Celiakia je choroba s výraznou genetickou predispozíciou (**Buc, 2005**).

Jedinou spoľahlivou diagnostickou metódou celiakie je odber vzorky črevnej sliznice – biopsia. Na celiakiu neexistujú lieky, jediným spoľahlivým spôsobom, ako sa uzdraviť, je vynechať zo stravy lepok. Ľudia, ktorí dôsledne nedodržiavajú bezlepkovú diétu, sa môžu dočkať ďalších komplikácií, napríklad môžu mať zvýšený sklon k nádorovému ochoreniu tráviaceho traktu (**Gamlinová, 2003**).

Krajčírová (2007) uvádza klinické prejavy celiakie u detí, pričom začiatok symptómov klasickej formy sa všeobecne vyskytuje medzi 6. až 18. mesiacom života. Táto forma sa charakterizuje chronickou hnačkou, neprospievaním, anorexiou, brušnou distenziou a stratou svalstva. Symptómy začínajú v priebehu týždňov až niekoľko mesiacov po zavedení potravín obsahujúcich prolamíny a potom nastupuje progresívna strata hmotnosti.

Michalík et al. (2001) uvádzajú, že na Slovensku je možné predpokladať okolo 3 000 – 5 000 chorých na celiakiu. Frekvencia výskytu intolerancie na lepkové bielkoviny v slovenskej populácii je cca 1 osoba na 500 – 1 000 ľudí.

Predpokladá sa, že celiakiou trpí viac ako milión Európanov (**Robinson, 2002**).

Potravinová intolerancia (falošná potravinová alergia) je podstatne častejšia ako pravá potravinová precitlivosť. U detí je pomer 8:2, u dospelých 7:3 v prospech nepravých (intolerančných) alergických reakcií. Výskyt skutočnej potravinovej alergie nie

je teda mimoriadne vysoký, závažná je však úmrtnosť. V Dánsku je to napríklad až 5 %, vo Francúzsku zomiera na potravinovú anafylaxiu až 150 ľudí ročne (Bjorkstén, 2001).

Tabuľka 1 Potraviny spôsobujúce neimunologické reakcie (Pružinec, 2002)

Potravina	Aktívna substancia
Alkohol	uvoľňovače histamínu
Ananás	uvoľňovače histamínu
Avokádo	vazoaktívne amíny
Banán	serotonín, histamín
Pivo	histamín, tyramín, sulfáty
Strukoviny	lektíny, hemaglutinín
Vaječné bielko	uvoľňovače histamínu
Jahody	histamín, uvoľňovače histamínu, aromatické látky
Kysnuté potraviny	vazoaktívne amíny
Haring	histamín
Kakao	uvoľňovače histamínu, fenyletylamín
Syry	histamín, tyramín, fenylalanín, aflatoxín
Kokos	aflatoxín
Losos	histamín
Kukurica	aflatoxín
Makrela	histamín
Orechy	aflatoxín
Paprika	kapsaicín
Salámy	histamín, tyramín, nitráty
Bravčové mäso	uvoľňovače histamínu
Sója	aflatoxín
Špenát	histamín
Tuniak	histamín
Paradajka	vazoaktívne amíny
Víno	histamín
Citrusové ovocie	vazoaktívne amíny, tyramín

V súčasnosti sa možno podľa **Štefanoviča (2004)** stretnúť so pseudoalergickými reakciami i po konzumácii potravín obohatených rôznymi aditívami, ako sú konzervačné látky (napr. kyselina sorbová a sorbáty, benzoáty, sulfidy), antioxidačné látky (napr. butylhydroxianisol), farbivá (napr. tartrazín, erytrozín, indigotín) a iné látky – napr. glutamáty, salicyláty, a iné.

Veľkým problémom (pri diagnostike, aj v prevencii) sú nedeklarované potravinové prísady a aditíva (**Bousquet et al., 1998**). Potravinové aditíva vedci zaraďujú do skupiny tzv. skrytých potravinových alergénov. Potravinársky priemysel začína využívať techniky genetických biotechnológií za účelom odstránenia alergénov z najpoužívanejších potravín.

Hyperkinetický syndróm (predráždenosť, nesústredenosť, poruchy chovania u detí školského veku) súvisí s príjmom väčšieho množstva farbív, konzervačných látok a salicylátov v potrave (**Molkhou, 2000**). Avšak aj geneticky modifikované potraviny môžu vykazovať rôznu stupeň alergenicity (**Kayserová, 2004**).

Čo sa týka potravinových aditív, napr. tartrazín (E 102) – je oranžové farbivo používané v najväčšom rozsahu. Je známym a častým potravinovým alergénom (reaguje 0,5 % populácie). Sulfity (E 223), ktoré sa používajú pre protibakteriálne a antioxidačné účinky okrem alergických reakcií u potravinových alergikov zhoršujú stav až u 10 % astmatických pacientov. Parabény sú pre svoje protibakteriálne a protiplesňové vlastnosti široko využívané v potravinárstve, ale aj pri výrobe liekov a kozmetiky. Obsahujú ich aj ústne vody a zubné pasty. Spôsobujú alergické reakcie, ktoré sa najviac prejavujú na koži (ekzém, žihľavka). Erytrozín (E 127) je rozpustné červené farbivo používané v potravinárstve i pri výrobe liekov. Býva príčinou alergických reakcií najmä u pacientov so známou alergiou na zeleninu. Alergické reakcie po benzoátoch (E 210 – E 219), konzervačných látkach, majú rozličný klinický obraz. Glutamát sodný (E 621) môže spôsobiť tzv. syndróm čínskej reštaurácie. Nie je vhodný pre konzumáciu u malých detí (**Pružinec, 2002**).

Podľa **Ferenčíka et al. (2004)** alergiu na potraviny spôsobujú aj rôzne potravinové prísady. Pritom sa u potravinových prísad nejedná o zanedbateľné množstvo. Priemerný jedinec skonzumuje ročne asi 4,5 kg potravinových prísad, čo je asi dvakrát viac ako pred tridsiatimi rokmi. Počas života zjeme priemerne 60 – 65 ton jedla a z toho asi 280 kg potravinových prísad, tzv. éčok.

1.4 Prevalencia potravinovej alergie

Kayserová (2004) uvádza, že naše potravinové zvyklosti sa od II. svetovej vojny zmenili niekoľkonásobne viac ako od prehistorických čias doposiaľ. Regionálne rozdiely súvisia s kultúrnymi (alergia na morskú potravu v prímorských krajinách, alergia na sóju v Japonsku, búrské oriešky v USA, vtáčie hniezda v Číne) a sociálnymi faktormi (pestré stolovanie s bohatým výberom aj netradičnej potravy, alebo jednoduché stravovanie zabezpečujúce prežitie).

Gamlinová (2003) uvádza, že určitý vplyv má aj frekvencia, s akou sa potravinu konzumuje. Napríklad alergia na ryžu je v Európe a Spojených štátoch veľmi zriedkavá, kým v Ázii sa s ňou stretávame často. Na západe spôsobuje alergie vyvolané protilátkami IgE najčastejšie pšenica, mlieko, vajcia a čoraz častejšie aj sója (v súčasnosti veľmi rozšírená v priemyselne spracovaných potravinách).

Robinson (2002) uvádza, že výskyt alergií sa môže medzi krajinami líšiť, čo je pravdepodobne odrazom spotreby potravín. Napríklad alergie z ryže a sóje sú oveľa bežnejšie vo Východnej Ázii, kde sú často hlavným jedlom, než v Európe. Naopak, v krajinách, kde sa vo veľkej miere konzumujú ryby (napr. v Dánsku) sa oveľa častejšie vyskytujú reakcie na ryby a mäkkýše.

Počet alergických chorôb v poslednom polstoročí má výrazne stúpajúcu tendenciu. Odhaduje sa, že v priemyselne vyspelých štátoch sa počet postihnutých osôb ročne zvyšuje o 5 %. Pred tridsiatimi rokmi sa napr. odhadovalo, že každý desiaty obyvateľ USA má alergiu, podľa súčasných odhadov je to už každý štvrtý obyvateľ. Vo Veľkej Británii sa predpokladá, že najmenej 40 % obyvateľstva prekoná alergickú reakciu aspoň raz za život. Odhaduje sa, že jedna štvrtina až jedna tretina osobitne mestskej populácie na Slovensku trpí na nejakú formu alergickej choroby (**Ferenčík et al., 2004**).

Prevalencia alergie na prelome 2. a 3. tisícročia je 30 – 40 % populácie vyspelých krajín sveta. Choroby, ako je alergická nádcha, priedušková astma či atopický ekzém, sa popri kardiovaskulárnych a onkologických chorobách stali skutočnými chorobami z civilizácie. Význam ochorení, na ktorých patogenéze sa zúčastňujú alergické mechanizmy, je daný aj socioekonomickou záťažou spoločnosti, výrazne zasahujú do kvality života postihnutých a tiež významne zaťažujú zdravotnícky rozpočet (**Hrubíško et al., 2003**).

V Európskej únii sa podľa zistení prejavuje alergická reakcia na potraviny u 3 až 7 miliónov populácie. Táto štatistika je v silnom rozpore s výsledkami prieskumu vykonaného vo Veľkej Británii (**Young et al., 1994**), podľa ktorých 20 % ľudí, resp. 1 človek z 5 pozoruje na sebe prejavy intolerancie alebo alergie na potravinu, resp. skupinu potravín (**Robinson, 2002**).

Potravinové alergie sa môžu pohybovať od mierne znervózňujúcich až po život ohrozujúce. Približne 30 000 Američanov navštívi každý rok ambulancie, aby boli ošetrení od ťažkých potravinových alergií, podľa siete pre potravinovú alergiu a anafylaxiu (Food Allergy and Anaphylaxis Network - FAAN). Odhaduje sa, že od 150 do 200 Američanov ročne zomrie následkom alergických reakcií na potraviny (**www.fda.gov**).

Podľa údajov Agentúry pre potraviny a liečivá v USA – U.S. Food and Drug Administration – U.S. FDA (**www.fda.gov**) jedenásť miliónov Američanov (alebo jedna z dvadsaťpäť osôb) trpí na potravinovú alergiu, asi 6,6 milióna je alergických na morské plody a viac ako 3 milióny sú alergickí na arašidy alebo orechy (**Sicherer et al., 2003; 2004**).

Potravinové alergie postihujú okolo 2 % dospelých a od 4 – 8 % detí v USA a počet mladých ľudí s potravinovými alergiami za zvýšil za posledné desaťročie, podľa súčasnej správy Centra pre prevenciu a kontrolu chorôb (Centers for Disease Control and Prevention - CDCP). U detí i s potravinovými alergiami sú viac pravdepodobné astma, ekzém a ostatné typy alergií (**www.fda.gov**).

Ferenčík et al. (2004) uvádza štyri kategórie príčin narastajúceho počtu alergií, ktoré sa môžu vzájomne podnecovať a pôsobiť komplexne:

- imunopatologické,
- environmentálne,
- genetické a
- neuroendokrinné.

Zároveň podľa tohto autora environmentálne príčiny predstavujú rôzne faktory životného prostredia, ktoré buď priamo spúšťajú alergickú reakciu vyúsťujúcu do alergickej choroby (alergény) alebo podporujú jej vznik. Medzi environmentálnymi faktormi treba na prvom mieste spomenúť alergény, ktoré sa nachádzajú vo vzduchu, ktoré dýchame (inhalačné alergény), v nápojoch a potravinách (potravinové alergény),

v kobercoch, po ktorých chodíme, a v posteľových prikrývkach (plesne a roztoče), v srsti a výlučkoch „domácich miláčikov“ (mačky, psy a pod.), v pracovnom prostredí (rôzne chemikálie) atď. Skupina alergických chorôb, ktorá sa označuje ako atopické choroby, sa spája s významnou genetickou predispozíciou (náchylnosťou). Táto predispozícia nie je viazaná na jeden určitý gén, ale na skupinu génov. Ak jeden z rodičov je atopik, možno predpokladať, že na 30 % ich deti budú taktiež atopici. V prípade, že obidvaja rodičia majú atopickú chorobu, ich deti majú asi 60 % pravdepodobnosť, že budú mať taktiež atopickú chorobu. Neuroendokrinné príčiny sa zúčastňujú na vzniku najmä prieduškovvej astmy, ale aj niektorých ďalších alergických chorôb. Ich súčasťou je pôsobenie rôznych neurotransmiterov a neuropeptidov – produktov centrálného a periférneho nervového systému na priebeh alergickej reakcie.

Najvyššiu prevalenciu pozorujeme u detí medzi 1,5 až 3 rokmi (25 % všetkých potravinových reakcií). U detí sú najčastejšími alergénmi mlieko, vajce, pšenica, arašidy, ryby, skryté alergény. U dospelých sú príčinou skrížene reagujúce potraviny s inhalačnými alergénmi (zelenina, ovocie, kôrovce, mäkkýše, vajce), mlieko, nesteroidné antireumatiká a potravinové aditíva. Tuhá strava sa pridáva až po 6 mesiaci života. Vysoko alergénna strava (orechy, vajcový bielok, sója, citrusové plody, pšenica) sa u rizikových detí odporúča až po ukončení prvom roku života. Pridávanie nových potravín u všetkých detí má byť postupné, s intervalom 1 – 3 týždne. Z faktorov vonkajšieho prostredia je nutná predovšetkým eliminácia pasívneho fajčenia v priebehu gravidity a kojenia. Aj detské kozmetické prípravky môžu obsahovať proteíny srvátky kravského mlieka, medu a vyvolať alergické prejavy (**Kayserová, 2004**).

Za fyziologických okolností sa IgE nachádzajú v krvnom sére v najnižšej koncentrácii zo všetkých Ig. Ak novorodenci majú v pupečníkovej krvi vyššie hladiny ako 10 IU/ml, znamená to vysoké riziko vzniku alergickej choroby počas ďalšieho života (**Ferenčík et al., 2006**).

Podľa **Kayserovej (2004)** presná prevalencia alergických potravinových reakcií nie je, na rozdiel od alergie na inhalačné alergény, známa. Súvisí to predovšetkým s problémami okolo definície. Až 30 – 40 % ľudí udáva „alergickú“ reakciu na niektorú z potravín, avšak výskyt skutočnej potravinovej precitlivenosti je podstatne nižší. Výskyt potravinovej alergie sprostredkovanej IgE protilátkami sa zvyšuje v závislosti s nárastom

atopických ochorení všeobecne, ale i so zmenou potravinových zvyklostí v jednotlivých krajinách.

Väčšina potravinových alergií sa začína v detstve. Prvý kontakt sa môže uskutočniť už pred narodením (prostredníctvom molekúl potravín, ktoré preniknú do plodu z matkinej krvi) alebo počas dojčenia (molekulami potravy z materského mlieka), takže dieťa môže niekedy reagovať alergicky už po prvom požití potravy. Niektoré deti z alergie vyrastú, najmä v prípade alergie na mlieko (80 % detí) alebo vajcia (50 % detí) (**Gamlinová, 2003**).

1.5 Potravinová alergia

Potraviny sa skladajú z bielkovín, cukrov a tukov. Tzv. hlavné alergény sú glykoproteíny s molekulovou hmotnosťou (M_r) 10 – 60 kD. Nemajú jednotné biochemické ani imunochemické vlastnosti (**Hrubiško et al., 2003**).

Ferenčík et al. (2006) definuje alergiu na potraviny – vyvolávajú ju potravinové alergény väčšinou prostredníctvom špecifických IgE. Sú to reakcie včasnej precitlivenosti prejavujúce sa rôznymi gastrointestinálnymi, kožnými, respiračnými alebo generalizovanými syndrómami, ktoré môžu vyústiť do anafylaxie. Potravinová alergia postihuje 6 – 8 % detí a 1 – 2 % dospelých. Prevažná väčšina alergických reakcií na potraviny sa vyskytuje už v prvom roku života.

Podľa **Gamlinovej (2003)** je potravinová alergia vo väčšine prípadov okamžitá a výrazná reakcia na potravinu, jej príznaky sa prejavujú v ústach, môže ju sprevádzať aj anafylaktická reakcia. Tento druh reakcie nastáva zvyčajne po požití potravy, pričom obvykle postihuje pery, jazyk, ústa a často aj hltan. Oveľa zriedkavejšie prichádza k reakcii až po niekoľkých hodinách od požitia potravy v podobe žalúdočných a črevných ťažkostí. V najľahšej podobe sa alergia vyvolaná protilátkami IgE prejavuje trpnutím alebo svrbením úst, niekedy ju sprevádza mierny opuch pier, sliznice úst a tváre. Závažnejšie reakcie spôsobujú výrazný opuch pier, jazyka a hltana. V oboch prípadoch ide o miestnu reakciu, pretože postihnuté sú tie miesta, ktoré prišli s potravinou do priameho kontaktu.

Ak je opuch jazyka silný, často vznikajú príznaky aj vo vzdialenejších častiach tela, vyvolané alergénmi, ktoré prenikli do krvného obehu. Táto reakcia sa nazýva systémová reakcia, pretože zasahuje organizmus ako celok, pre systémovú alergickú reakciu sa

používa tiež názov anafylaxia. Ak je natoľko silná, že spôsobí kolaps, ide o anafylaktický šok.

V Európskej Bielej knihe alergie sa uvádza, že zložky potravy, ktoré vyvolávajú precitlivosť, sa odlišujú v závislosti od veku pacienta, zemepisnej oblasti i stravovacích návykov. Štúdie napr. preukázali, že u 15 – 30 % detí s alergiou na mlieko alebo vajcia pretrváva táto alergia až do neskoršieho veku, zatiaľ čo alergia na burské oriešky a rybie mäso trvá obvykle len prechodne, niekoľko rokov. Potravinová alergia sa dospelým môže objaviť v každom veku, napríklad v súvislosti s črevným ochorením (**www.alergie.cz**).

1.6 Klinické príznaky potravinovej alergie

Alergická reakcia sa prejaví najčastejšie na koži (45 %), v dýchacích cestách (25 %), tráviacej sústave (20 %) a srdcovo-cievnom systéme (asi 10 % - anafylaktický šok). Väčšinou však u pacientov možno pozorovať príznaky z viacerých orgánových systémov, najčastejšie v zmysle kožných a respiračných (**Kayserová, 2000**).

Príznaky alergickej reakcie na potraviny môžu byť rôzne, najčastejšou býva žihľavka až angioedém (opuch tváre, uší, prípadne iných častí tela). Časté sú aj prejavy na dýchacích cestách – alergická nádcha, astma a v gastrointestinálnom trakte – zápcha alebo hnačka, bolesti žalúdka a brucha, ťažoba, nutkanie na zvracanie. Najťažším príznakom je celková anafylaktická reakcia, ktorá môže vyústiť do anafylaktického šoku až smrti (**Ferenčík et al., 2004**).

Jedným z najčastejších prejavov potravinovej alergie je tzv. orálny resp. oropharyngeálny alergický syndróm (OAS). Ako orálny alergický syndróm (OAS) sa označujú prejavy lokálnej alergickej reakcie v ústnej dutine a perorálne po požití ovocia a zeleniny (**Sampson, 2001**).

Orálny alergický syndróm zahŕňa alergickú reakciu pacientov precitlivených na rastlinné peľe po konzumácii niektorých tepelne neopracovaných potravín, najmä zeleniny a ovocia. Reakciu vyvolávajú termolabilné alergény, ktoré sa nachádzajú v peľi aj v požitej potravine (**Ferenčík et al., 2006**).

Orálny alergický syndróm sa obvykle manifestuje ako svrbenie, alebo opuchy pri kontakte so sliznicou pier a ústnej dutiny (**Kvasničková et al., 2005**).

U jednej skupiny ľudí postihnutých potravinovými alergiami nenastáva nijaké zhoršenie. Sú to pacienti s orálnym alergickým syndrómom (OAS). Ide o tŕpnutie a svrbenie úst pri konzumácii určitých druhov ovocia či zeleniny, vyvolané skríženou reakciou na peľ alebo na latexovú gumu. Orálny alergický syndróm zvyčajne neprekračuje hranicu ľahkej reakcie obmedzenej na ústa (**Gamlinová, 2003**).

1.7 Alergické ochorenia

Alergická a chronická nealergická nádcha (rinitída) patria medzi civilizačné choroby. Ich výskyt sa v priebehu 20. storočia zvýšil až 10 – násobne na súčasných približne 25 % populácie. Výskyt je vyšší u obyvateľov mestských aglomerácií. Iba niečo vyše 50 % prípadov chronickej neinfekčnej nádchy tvorí alergická nádcha (t.j. taká, pri ktorej sa dá dokázať mechanizmus sprostredkovaný IgE). Z alergickej nádchy približne tretina prípadov pripadá na sezónnu alergiu, tretinu tvoria pacienti na celoročné alergény a ďalšiu tretinu predstavuje alergická nádcha zmiešanej genézy (**Hrubíško et al., 2003**).

Polinóza je alergická choroba vyvolaná peľom, presnejšie alergénmi, ktoré sa nachádzajú v peľových zrnkách polinóznych rastlín. Najčastejšie sa klinicky prejavuje formou alergickej nádchy (**Ferenčík et al., 2006**).

Najčastejším alergickým ochorením oka je alergická konjunktivitída – zápal spojiviek. Prejavuje sa až u 25 % populácie (**Pružinec, 2002**). Obyčajne však býva príznakom alergickej konjunktivitídy:

- svrbenie očí,
- červené oči (zvýraznené cievy),
- pálenie očí,
- slzenie, často veľmi intenzívne,
- citlivosť na svetlo.

Astma je ochorením, na ktoré sa vynakladajú enormné ekonomické prostriedky, a aj keď ho dnes dokážu moderné farmakologické i nefarmakologické prostriedky do veľkej miery zvládať, jeho incidencia i prevalencia sa celosvetovo zvyšujú a predstavuje v pravom zmysle slova civilizačnú epidémiu 3. tisícročia. Astma patrí medzi najčastejšie chronické ochorenia detského veku. Podľa Globálnej iniciatívy pre astmu (angl. Global Initiative for Asthma), astma je chronickým zápalovým ochorením dýchacích

ciest, pri ktorom má úlohu mnoho bunkových elementov. Tento chronický zápal vyvoláva vznik a prehlbovanie bronchiálnej hyperreaktivity s následnými opakovanými epizódami piskotov, dýchavice, tiesne na hrudníku a kašľa, predovšetkým v noci alebo v skorých ranných hodinách (**Hrubiško et al., 2003**).

Žihľavka (koprivka) dostala svoje meno po známej burine, ktorá po kontakte s pokožkou spôsobuje typické svrbivé drobné pupence s premenlivým tvarom a prchavým výskytom. Svojou podstatou je vyvolaná aktiváciou mastocytov, ktoré uvoľnia mediátory s následným rozšírením drobných cievok v koži a ich zvýšenou priepustnosťou (**Pružinec, 2002**).

Akútna žihľavka a angioedém sú kľúčovými príznakmi potravinových alergií a často patria k obrazu ťažkej alergickej reakcie, známej ako anafylaktický šok (**Gamlinová, 2003**).

Atopický ekzém (atopická dermatitída) je chronické zápalové ochorenie kože, ktoré býva jedným z prvých klinických obrazov alergie. Jeho výskyt v populácii je vysoký až 15 – 20 %. Pravdepodobnou príčinou výrazného zvyšovania počtu postihnutých detí je dôsledok zhoršeného životného prostredia, väčšieho kontaktu s alergénmi, najmä roztočmi, kratšieho dojčenia a ďalších faktorov (**Pružinec, 2002**).

Príkladom patologickej reakcie oneskoreného typu hypersenzitívnosti je alergická kontaktná dermatitída – AKD (synonymum je ekzémová kontaktná alergia). Vyvíja sa po kontakte rôznych látok s povrchom tela, pri ktorom sa nadviažu na proteíny kože a zmenia sa tak z neplnohodnotných antigénov (hapténov) na plnohodnotné, schopné vyvolať imunitnú odpoveď, vedúcu v týchto prípadoch k hypersenzitívnym, patologickým reakciám. Známymi látkami vyvolávajúcimi AKD sú kovy (napr. chróm, nikel) nachádzajúce sa v retiazkach, náramkoch, náprstkoch a pod., rôzne chemikálie (napr. formaldehyd, epoxid, peruánsky balzam, lanolín, farbivá a iné), lieky (napr. neomycín), z rastlín kontaktnú precitlivosť vyvoláva brečtan (**Buc, 2005**).

Biela kniha alergie EÚ uvádza, že poznatky o prevalencii a incidencii kontaktnej dermatitídy sú stále len útržkovité, pretože bežne registrované údaje nemajú dostatočnú informačnú hodnotu. Kontaktná dermatitída býva len zriedka príčinou hospitalizácie a pacienti ambulantných zariadení predstavujú len malú časť skutočnej incidencie. V štúdiách z USA a krajín Európskej únie sa celkový počet chorých v populácii ako celku odhaduje na 1 % (**www.alergie.cz**).

1.8 Anafylaxia

Termín „anafylaxia“ použil ako prvý r. 1911 Charles Robert Richet, parížsky lekár a nositeľ Nobelovej ceny v roku 1913. Richet spolu s francúzskym fyziológom P. I. Portierom experimentovali s podávaním malých dávok živočíšnych toxínov psom. Ich cieľom bolo navodiť odolnosť psov na tieto toxíny. Po podaní toho istého toxínu určitému psovi sa namiesto odolnosti objavili u neho ťažké kŕčovité príznaky často končiace uhynutím pokusného zvieratá. Keďže navodenie odolnosti sa označovalo „profylaxia“, nazvali jav, ktorý pozorovali u psov, a ktorý mal opačný efekt „anafylaxiou“ (Ferenčík et al., 2004).

Podľa najnovších štatistík sa však aj u dospelých dostala anafylaxia zapríčinená konzumáciou potravy na prvé miesto (Sampson, 2001).

Gamlinová (2003) uvádza, že pojem anafylaxia zaviedol v roku 1902 istý francúzsky lekár, ktorý ho odvodil od dvoch gréckych slov. Ide o vystupňovanú alergickú reakciu mimoriadnej intenzivity. Jej príznaky, približne v nasledujúcom poradí, sú:

- svrbenie celého tela,
- výsyp žihľavky kdekoľvek na tele,
- celkový opuch podkožia, spôsobený únikom tekutiny z vlásočníc do tkanív (angioedém),
- občasné chraptanie v dôsledku opuchu hrtana,
- v ojedinelých prípadoch kýchanie a upchatý nos alebo problémy s očami,
- problémy s dýchaním, prehltaním či rozprávaním,
- sčervenaná tvár a celkový pocit tepla,
- rýchly pulz, búšenie srdca,
- úzkosť, dezorientácia a (čo je najtypickejšie) pocit blížiacej sa smrti,
- kŕčovité bolesti brucha,
- pomočenie alebo hnačka,
- závraty, mdloby a bezvedomie v dôsledku náhleho poklesu krvného tlaku.

Od prvých príznakov až do konca, často definitívneho, môže uplynúť menej než hodina.

Anafylaxia je hypersenzitívna (precitlivená) reakcia imunitného systému na opakovaný kontakt s určitým alergénom, na ktorej sa zúčastňujú špecifické protilátky triedy IgE (nazývajú sa preto reagíny) a bunky (najmä žirné bunky a krvné bazofily), ktoré

sú schopné uvoľňovať mediátory anafylaxie. Tieto svojimi farmakologickými účinkami spôsobia lokálne (miestne) alebo celkové (systémové) klinické prejavy zvyčajne vyúsťujúce do poškodzujúceho alergického zápalu. Lokálna anafylaxia sa môže vyskytnúť napr. na koži (urtika – žihľavka), na sliznici nosa (alergická nádcha) alebo na sliznici tráviaceho ústrojenstva (hnačka, zápcha, kŕče). Systémová anafylaxia postihuje viaceré orgány a tkanivá. Jej najťažším prejavom je anafylaktický šok, ktorý aj pri rýchlej lekárskej pomoci často končí smrteľne (**Ferenčík et al., 2004**).

Klinicky sa anafylaktická reakcia môže prejavovať od najľahšej formy – urtikárie až po najťažšiu – anafylaktický šok. Ďalšie klinické prejavy anafylaxie sú: nauzea a zvracanie (spôsobené edémom a kontrakciou hladkého svalstva gastrointestinálneho traktu), angioedém (opuch napr. jazyka, pier, očných viečok, mäkkého podnebia, hrtana, edém hrtana tzv. Quinckeho, môže mať rýchly a smrteľný priebeh), dusenie (spôsobené kontrakciou hladkého svalstva bronchov) a hypotenzia (zapríčinená zvýšenou permeabilitou ciev, ktorá spôsobí únik tekutiny z krvného riečiska do tkanív. Na tomto účinku sa spolupodieľa aj redukovaná kontrakcia myokardu. Najťažšiu formu anafylaktickej reakcie predstavuje anafylaktický šok. Klinicky sa prejavuje ako bolesť hlavy, bolesť v oblasti srdca, pocit tepla, generalizovaný pruritus, erytém, urtika, zvracanie, koliky v bruchu, hnačka, dušnosť, tachykardia, pokles krvného tlaku. Niekedy dochádza k akútne obetovému zlyhaniu. Reakcia prebieha veľmi rýchlo a môže viesť k smrti v priebehu niekoľkých minút. Príkladom anafylaktickej reakcie môže byť alergia na antiséra (antitetanové a iné, odtiaľto pochádza aj pôvodný názov – sérový šok), vakcíny, toxoidy, pichnutie hmyzom, alergény používané na hyposenzibilizáciu (peľ, srseľ, domáci prach), liečivá (penicilín), biologické extrakty (napr. inzulín), potraviny (**Buc, 2005**).

Anafylaktický šok je najťažšia forma anafylaktickej reakcie, ktorá sa objavuje niekoľko sekúnd až minút po opakovanom podaní alergénu (niektoré liečivá a diagnostické prípravky, cudzorodé sérum, uštipnutie včelou, osou alebo iným hmyzom, niektoré biologické extrakty a zložky potravy) a môže mať za následok rýchlu smrť postihnutého. Prejavuje sa slabosťou, ťažobou, bolesťami najmä hlavy a v oblasti srdca, tlakom na prsiach, hnačkou, závratou, dusením a znížením krvného tlaku. Liečbu, ktorej kľúčovou úlohou je zabezpečiť priechodnosť dýchacích ciest a udržanie krvného tlaku, treba zahájiť okamžite po objavení sa prvých príznakov (**Ferenčík et al., 2006**).

Anafylaktická reakcia, sa najčastejšie začína svrbením pier, hrdla, dlaní alebo chodidiel a lokálnou, postupne sa rozširujúcou žihľavkou. Prechádza do multiorgánovej reakcie s vazodilatáciou, zvýšenou permeabilitou ciev a bronchiálnou obštrukciou a kulminuje hypotenziou až šokom. Anafylaktická reakcia sa vyznačuje veľmi rýchlym nástupom krátko po zjedení potravy a bez okamžitej pomoci postihnutému môže končiť smrťou. Príčinou býva zlyhanie krvného obehu, alebo udusenie v dôsledku opuchu hrdla **(Sabolová, 2004)**.

Najčastejšie sa takéto ťažké život ohrozujúce reakcie vyskytujú po požití arašidov, orechov, rýb, kôrovcov, mäkkýšov, vajcového bielka alebo mlieka. Smrteľné reakcie sa môžu rozvinúť rýchlo, alebo začínajú miernymi symptómami, ktoré po 1 – 3 hodinách vyústia do kardiovaskulárneho zlyhania **(Sampson, Metcalfe, 1993)**.

Na základe rozborov život ohrozujúcich a smrteľných anafylaxií boli stanovené najmenšie množstvá jednotlivých potravín, ktoré môžu vyvolať alergické príznaky u najviac citlivých osôb, tzv. prahové dávky. Preukázalo sa napr., že u extrémne citlivých pacientov, môže byť prahová dávka už 0,005 mg kravského mlieka, alebo 0,002 mg slepačieho vajca **(Sabolová, 2004)**.

1.9 Najznámejšie alergény živočíšneho pôvodu

Pružinec et al. (2002) uvádza, že ryby, mäkkýše, kôrovce – patria medzi najčastejšie potraviny živočíšneho pôvodu, ktoré spôsobujú alergické reakcie. Morské ryby sú častejšie príčinami alergií ako sladkovodné.

Jednotlivé druhy charakterizuje nasledovne:

Haring (*Clupea harengus*) – je známou rozšírenou rybou s rozličnými spôsobmi spracovania. Okrem bežných je delikatesou najmä nakladaný v rozličných kyslých a sladkokyslých omáčkach. Nie je častým alergénom. Skrížené reakcie bývajú so sardinkami.

Losos (*Salmo salar*) – surový (údený) spôsobuje alergie častejšie ako tepelne upravený. Skríženú reaktivitu máva s treskou.

Makrela (*Scomber scombrus*) – morská ryba, ktorá patrí medzi ryby, ktoré sú veľmi častou príčinou alergických reakcií. Pri zlom skladovaní sa bielkovina histidín, ktorá je v jej mäse v pomerne vysokej koncentrácii, mení pôsobením bakteriálnych enzýmov

na histamín. Ten spúšťa mechanizmy, ktorých výsledkom je klinický obraz alergickej reakcie.

Sardinka (*Sardina pilchardus*) – predstavuje takmer štvrtinu v zastúpení celosvetového lovu rýb. Najčastejšie býva konzumovaná v oleji alebo vo vlastnej šťave.

Treska (*Gadus morhua*) – predstavuje najčastejšiu príčinu alergických reakcií spomedzi rýb. Konzervuje sa rozličnými spôsobmi – solená, údená, mrazená, zohrievaná do konzerv. Okrem kožných alergických reakcií spôsobuje i ťažké reakcie dýchacích ciest – až astmatické záchvaty. Citliví pacienti reagujú až anafylaktickou reakciou. Záchvat dušnosti môže vyvolať už zápach tresky. Alergická reakcia je tak na surovú (údenú) rybu, ako aj na varenú, takže alergény obsiahnuté v nej vzdorujú tepelnej úprave. Pacienti alergickí na tresku môžu reagovať na iný druh ryby, ale nie je vylúčená ani možná tolerancia.

Tuniak (*Thunnus albaceres*) – pripravuje sa tepelne spracovaný, konzervovaný i surový (japonské suši). Konzervárensky upravený vyvoláva najmenej alergických reakcií. Podobne ako makrela pri zlom skladovaní môže zvýšiť obsah negatívnych látok (histamín) a u konzumenta spôsobiť symptómy podobné alergii.

Krab (*Cancer pagurus*) – je známych viac ako 50 tisíc druhov. Krabie mäso býva nezriedkavou príčinou alergických reakcií, často závažného klinického charakteru. Krížová reaktivita s inými kôrovcami býva bežná.

Homár (*Homarus gammarus*) – kôravec, konzumuje sa čerstvo varený, alergické reakcie nebývajú časté, niekedy však vykazuje skríženú reaktivitu s inými kôrovcami.

Langusta (*Palinurus vulgaris*) - kôravec, konzumuje sa čerstvo varený alebo sa dodáva v mrazenom stave. Alergické reakcie bývajú skrížené s reakciami na ostatných kôrovcov.

Kreveta (*Pandalus borealis*) – kôravec, konzumuje sa čerstvo varený, konzervovaný v rozličných nálevoch a je dostupný i skladovaný v mrazenom stave. Spomedzi morských živočíchov je najčastejším potravinovým alergénom. Klinické reakcie sa prejavujú od kožných prejavov cez dýchacie a tráviace ťažkosti až po anafylaktické reakcie.

Hovädzie mäso – zriedkavo spôsobuje alergické reakcie a aj pacienti alergickí na kravské mlieko ho vo väčšine prípadov môžu bez obáv konzumovať (**Pružinec et al., 2002**).

Alergia na hovädzie mäso je zriedkavá, aj to u pacientov alergických na kravské mlieko. Hovädzie mäso však obsahuje hovädzí (bovinný) sérový albumín a gamaglobulín, termolabilné súčasti kravského mlieka, preto môže vzniknúť alergická reakcia u pacientov alergických na tieto súčasti kravského mlieka po požití surového hovädzieho mäsa (napr. tatársky biftek). Jahňacina a baranina obsahujú veľmi slabé alergény, alergénnosť sa ešte znižuje tepelným spracovaním a pepsínom, a preto sa používajú ako alternatíva hydrolyzátov kravského mlieka. Podľa rôznych štúdií sa prevalencia alergie na bravčové mäso pohybuje od 1,5 do 20 %. Príbuznosť sérového albumínu rôznych živočíšnych druhov vysvetľuje aj pomerne častý výskyt skríženej alergie u pacientov s alergiou na mačaciu srst' a bravčové mäso, tzv. syndróm bravčovina-mačka (pork-cat). Mäso domácich králikov aj divokých zajacov vykazuje veľmi nízku alergénnosť. Alergia na konské mäso sa takmer nevyskytuje, významnejšia je inhalačná alergia a senzibilizácia konskými vakcínami (**Hrubíško et al.,2003**).

Bravčové mäso – alergické reakcie na konzumáciu bravčového mäsa nebyvajú časté. Zaujímavá u pacientov s alergiou na bravčové mäso je skrížená reaktivita na epitel mačky – inhalačná alergia (**Pružinec et al., 2002**).

Slepačie vajce – je jedným z najfrekvencovanejších alergénov. U detí býva obyčajne prvým potravinovým článkom, na ktorý sa vyvinie alergická reakcia. Vaječný bielok predstavuje časť vajca, ktorá obsahuje viac alergénnych zložiek (ovalbumín, ovomukoid, lyzozym, ovotransferín). Vyvoláva najmä včasne sa prejavujúce kožné symptómy – žihľavku a atopický ekzém. Bežné sú skrížené reakcie medzi bielkami slepačích i iných vajec. Žltok, ktorý má odlišné zloženie, býva menej často príčinou alergií. Pacienti alergickí na vaječné bielkoviny musia byť opatrní pri očkovaní. Niektoré očkovacie látky sú pestované na vajíčkach, takže pri podaní môžu spôsobiť alergickú reakciu (chrípkové vakcíny, vakcína proti žltej zimnici).

Alergia na proteíny kravského mlieka sa vyskytuje u 0,5 až 4 % dojčiat, ochorenie najčastejšie pretrváva do veku 3 – 15 rokov (**Rimárová, Lovayová, 2007**).

Kravské mlieko – patrí ku frekvencovaným príčinám alergických reakcií, najmä u detí. U detí sú najčastejšími klinickými prejavmi kožné – najmä ekzém – a tráviace. U týchto detí sa vo väčšine prípadov neskôr vyvinie alergia aj na iné potraviny, ako aj na inhalačné alergény. Viacero autorov potvrdilo priaznivý vplyv dlhého dojčenia a vyhnutie sa konzumácii kravského mlieka na zdravotný stav detí, u ktorých je vyššie

riziko vzniku alergie. Alergici sa musia vyhýbať aj iným druhom mlieka – napr. kozie, ovčie. Najdôležitejšie alergizujúce zložky mlieka sú mliečna srvátka a jej zložky: laktalbumín, laktoglobulín, kazeín (**Pružinec et al., 2002**).

V patogenéze alergie na mlieko má úlohu prenatálna senzibilizácia, alergia však môže vzniknúť aj v dospelosti. Najčastejším typom imunopatologickej reakcie je I. typ (IgE), ale sú dôkazy aj o III. a IV. type reakcií. Kravské mlieko obsahuje viac ako 20 proteínov vyvolávajúcich alergickú reakciu. Najdôležitejšie sú: kazeín, betalaktoglobulín, sérový albumín a imunoglobulíny (**Wal, 1998**).

Odhaduje sa že 9 z 10 reakcií spôsobujú kravské mlieko, slepačie vajcia, sója, arašidy, orechy, alebo pšeničný glutén (**Robinson, 2002**).

V stredoeurópskom regióne sa percentuálne uvádza najčastejšia alergia na kravské mlieko, na druhom mieste slepačie vajce, za tým nasledujú ryby a menšou mierou sa podieľajú jednotlivé druhy ovocia, zeleniny, v malej miere i strukoviny (**Šimončič, 1997**).

Alergia na bielkovinu kravského mlieka (β -laktoglobulín, α -laktalbumín, bovinný imunoglobulín, bovinný albumín) je najčastejšou potravinovou alergiou v ranom detstve s incidenciou 2 až 3 % počas 1. roku života. U výlučne dojčených detí je riziko rozvoja alergie na bielkovinu kravského mlieka len 0,5 % a prejavy alergie sú mierne alebo stredne závažné. Atopický ekzém patrí medzi najčastejšie prejavy alergie na bielkovinu kravského mlieka (**Havlíčková et al., 2008**).

1.10 Najznámejšie alergény rastlinného pôvodu

Koreniny sú rastlinné druhy, ktoré obsahujú aromatické substancie využívané pri príprave jedál na zlepšenie chuťových vlastností jedla. Zuzitkovávajú sa celé rastliny alebo ich časti (plody, semená, listy, korene, hľuzy, podzemky, ...), a to buď celé, alebo sa drvčia, či melú na práškové korenie. Vonné oleje, silice a iné dráždivé látky môžu vyvolať lokálne kožné aj sliznicové podráždenie a I. aj IV. typ alergickej reakcie. Druh reakcie závisí od spôsobu expozície. Inhalácia korenín (mleté – práškové korenie) vyvoláva prejavy alergickej astmy a rinokonjunktivitídy. Éterické oleje a silice mnohých korenín sa pridávajú do kozmetických a liečebných prípravkov, zubných pást a sú častou príčinou kontaktnej dermatitídy a stomatitídy. Antigén alebo jeho epitop v tej istej potrave môže byť odlišný podľa cesty expozície (**Hrubiško et al., 2003**).

Potravinová alergia na antigény rastlinného pôvodu je častejšia u dospelých, väčšinou ako dôsledok inhalačnej senzibilizácie, najčastejšie peľovými alergénmi. Klasickým prejavom je orálny alergický syndróm (OAS). Fyzikálno – chemické vlastnosti alergénu podmieňujú jeho schopnosť prekonať fyziologické bariéry, ako sú žalúdočná kyselina a proteázy gastrointestinálneho systému (**Breiteneder a Ebner, 2001**).

Pružinec (2002) uvádza nasledovné informácie k obilninám, strukovinám, orechom a semenám, ovociu a zelenine, citrusovým plodom a zelenine, koreninám:

Jačmeň – pacienti alergickí na jačmenné výrobky a nezriedka destiláty a pivo, krížovo reagujú na raž a pšenicu.

Pohánka – v Japonsku patrí medzi hlavné alergény – používa sa pri príprave často konzumovaných rezancov.

Kukurica – používa sa v celom rade potravinárskych výrobkov z kukuričnej múky, ale aj ako varená – samostatne, alebo v šalátoch. Je častou súčasťou detských potravín.

Proso – s ostatnými obilninami má len zriedkavú skríženú reakciu, takže tento typ obilnín možno použiť ako náhradu u pacientov alergických na pšenicu alebo ryžu.

Ovos – v posledných desaťročiach patrí medzi často používané potraviny – najmä ako výhodný vlákninový stravovací doplnok vo forme vločiek, lupienkov a podobných raňajkových foriem.

Ryža – poskytuje 20 % z celkových kalórií skonzumovaných denne vo svete. Nepatrí medzi časté potravinové alergény.

Pšenica – patrí vo svete k najpoužívanejším potravinovým článkom. Pšenica býva veľmi často – ako tzv. „skrytý alergén“ súčasťou mnohých ďalších potravinových výrobkov. Nakoľko precitlivosť na pšenicu je nezriedkavým javom – tak u detí, ako aj u dospelých, je potrebné vyhýbať sa najmä výrobkom, označovaným ako „fast food“, kde informáciu o prítomnosti pšeničnej múky v potravine nemusí vedieť ani predávajúci. Pacienti alergickí na pšenicu môžu ako náhradu konzumovať výrobky z ryžovej a kukuričnej múky.

Červená a biela fazuľa – pacienti často krížovo reagujú i s inými strukovinami.

Sójové bôby – vzhľadom na rozšírenosť konzumácie, zaslúžene patria medzi časté príčiny alergických reakcií. Krížová reaktivita býva s hrachom, burskými orechami, ale aj s inými strukovinami.

Hrach a šošovica – v našich zemepisných šírkach nebýva častým alergénom (v Indii je šošovica na 5. mieste).

Arašidy (burské oriešky, podzemnica) – patria medzi najrozšírenejšie potravinové alergény vôbec. V USA sú na prvom mieste, z dôvodu, že používanie arašidového masla je v americkej kuchyni všeobecne zaužívané. Arašid ako alergén je nebezpečný tým, že jeho tuk sa pridáva do celého radu potravín, pričom často na obale potraviny táto skutočnosť nebýva označovaná. Popísali sa i stopy arašidových alergénov v potravinách, kde sa bežne nepridávajú – ako následok predchádzajúceho výrobného procesu v potravinárskych strojoch. Po požití takýchto potravín došlo k ťažkým alergickým reakciám. V USA ročne zomrie niekoľko desiatok ľudí na následok anafylaktického šoku po požití arašidov alebo ich zložiek. Krížová reakcia môže byť s ostatnými strukovinami.

Alergia na orechy a arašidové orechy môže začínať v ranom veku, vo väčšine prípadov je celoživotná a môže byť fatálna (**Rimárová, Lovayová, 2007**).

Mandle – podľa prítomnosti či neprítomnosti glykozidu, ktorý sa nazýva amygdalín, ich delíme na horké a sladké typy. Jadrá sa konzumujú buď samostatne – pražené a solené, alebo ako súčasť rozmanitých výrobkov – zmrzlina, čokolády, koláče, pudinky a žuvačky. Mandľový olej sa často používa v kozmetických výrobkoch.

Brazílske orechy – pochádzajúce z Južnej Ameriky, z dažďových pralesov v oblasti Amazonky. Orišky majú vysokú nutritívnu hodnotu s 60 % i viacpercentným obsahom oleja a 17 % bielkovín. Alergické reakcie nebývajú zriedkavé, skrížene reagujú i pacienti alergickí na kešu oriešky a pistácie (**Pružinec, 2002**).

Kešu orechy – sú jadrami stromu „acajú“ z oblasti tropickej Ameriky, ale aj Indie, Mozambiku a niektorých afrických krajín. Nebývajú častým alergénom. Spôsobujú u alergikov najmä tráviace obtiaže.

Kokosový orech – exportuje sa z Ázie a tropických ostrovných štátov. V potravinárskom priemysle sa používa mlieko, olej a dužina. I keď nie je častým alergénom, vzhľadom na jeho všeobecnú rozšírenosť v potravinárskych výrobkoch predstavuje pre alergikov riziko. Ako „skrytý alergén“ sa môže nachádzať v rozličných cukrárenských a pekárenských výrobkoch, raňajkových cereáliách (vločky, lupienky), ako aj v rôznych nápojoch.

Lieskové orechy – sú pomerne častým potravinovým alergénom. Na senzibilizácii pacientov sa podieľa aj fakt, že peľ liesky je častým inhalačným alergénom. U pacientov s alergiou na lieskovce je vysoký výskyt inhalačnej alergie na peľ brezy a iných stromov.

Pekan – pochádza z juhu USA a Mexika. Alergické reakcie nie sú časté.

Pistácie – zelenkavé semená, z drobných stromov, pochádzajúce zo Stredného východu. Konzumujú sa samotné – pražené, solené, alebo ako súčasť rozmanitých cukrovín, zmrzlín, koláčov.

Sezam – semená pochádzajú z tropických a subtropických oblastí. Používajú sa na ozdobovanie chleba a pečiva a do výplní pekárskeho výrobkov. Olej sa používa na varenie i ako náplň margarínov. Ako „skrytý alergén“ sa môžu nachádzať v rozličných potravinách.

Sezamové semená sú silným alergénom. V posledných rokoch došlo ku zvýšeniu počtu a závažnosti reakcií na sezam v strave, a to v dôsledku zvyšujúceho sa použitia sezamu a i sezamového oleja v potravinách. Alergia na sezam sa vyskytuje u 0,7 – 1,2 % populácie. Po dlhodobej expozícii sezamom dochádza k výskytu astmy a nádchy, žihľavky po kontakte. Alergén Ses i 1 vykazuje 40 % podobnosť s alergénmi semien slnečnice, para-orechov a ricínových bôbov, Ses i 3 vykazuje 41 % podobnosť s alergénom vlašských orechov Jug r 2 a 36 % podobnosť s alergénom arašidov Ara h 1. Najnižšia zistená dávka vyvolávajúca reakciu je 30 mg sezamového semienka, anafylaktický šok môže nastať po konzumácii 1 – 5 ml sezamového oleja (www.agronavigator.cz).

Vlašské orechy – alergické reakcie na vlašské orechy bývajú časté. Pacienti často skrížene reagujú na čerešne.

Jablko (*Malus sylvestris*) – alergia na jablko je častá. Nadpolovičná väčšina pacientov alergických na peľ brezy, reaguje i na konzumáciu jablák, obyčajne tzv. orálnym alergickým syndrómom (svrbenie a opuch v oblasti úst). Skrížená býva i reakcia na lieskovec, mrkvu a zemiak. Napriek existencii viac ako tisíc variet jablák (Jonatan, Golden delicious, ...), alergický pacient reaguje na všetky (**Pružinec, 2002**).

Banán (*Musa spp.*) – alergia na banán je častá u pacientov s alergiou na latex a peľových alergikov. Skrížené reakcie sa pozorovali s uhorkou a melónom.

Broskyňa (*Prunus persica*) – býva častým alergénom najmä v oblasti Stredomoria. V našich územiach je častou reakciou orálny syndróm, čo mnohí pacienti pripisujú podráždeniu oblasti úst „chĺpkami“ na obale.

Marhuľa (*Prunus armeniaca*) – alergicky reagujú na ne najmä pacienti s alergiou na peľ brezy.

Čerešňa (*Prunus avium*) – alergia na čerešne sa vyskytuje najmä u pacientov s alergiou na peľ brezy.

Hrozno (*Vitis vinifera*) – nebýva častým alergénom. Popisované reakcie na konzumáciu vína obyčajne bývajú zapríčinené chemickými aditívami alebo histamínom, ktorý sa v ňom nachádza.

Citrón (*Citrus limon*) – citróny obsahujú vysoké množstvo kyselín, ktoré môžu byť zodpovedné za niektoré klinické symptómy, ktoré nemusia byť alergickou reakciou. Podľa **Hrubiška et al. (2003)** sú urtikária, astma a ekzém častými prejavmi alergie po požití citrónu, príčinou však je i vysoký obsah aromatických látok, biogénnych amínov (tyramín) a prirodzených farbív. Väčšina nežiaducich reakcií súvisí s vysokým obsahom kyselín (kyselina chlóravá). Alergény grapefruitu sa nachádzajú v jadrách, ktoré sa nekonzumujú, a preto sú pravé alergické reakcie zriedkavé. Mandarínka má tiež vysoký obsah kyselín a rastlinných olejov, alergény sú spoločné pre celú skupinu citrusov. Klasické alergické reakcie nie sú zriedkavé, najmä po požití väčšieho množstva naraz spolu s jadierkami. Alergény pomaranču sa nachádzajú v jadierkach, spôsobujú alergickú reakciu (urtika, astma, ekzém). Aromatické oleje v šupke sú príčinou kontaktnej dermatitídy.

Grapefruit (*Citrus pardisi*) – alergické reakcie sú bežné, skrížené reakcie sú známe s ostatnými citrusovými plodmi.

Pomaranč (*Citrus sinensis*) – alergické reakcie nie sú zriedkavé. Okrem šťavy ju môžu spôsobovať aj bielkoviny, ktoré sa nachádzajú v jadierkach.

Mandarínky, tengeríny, limety, pomelá a hybridy – klementínky a tangelá: všetky vykazujú skríženú reakciu. Pacient, ktorý o sebe vie, že je alergický na niektorý z citrusových plodov, by mal zo stravy vylúčiť aj ostatné.

Prejavy potravinovej alergie má približne 8 % dojčiat. S vekom dochádza k poklesu jej prevalencie, ktorá je u dospelých v rozmedzí 1 – 2 %. Vymiznutie príznakov je najčastejšie vysvetľované oneskoreným navodením orálnej imunologickej tolerancie na potravinové alergény. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce potravinové alergény patria kravské mlieko, vajcia, obilniny, sója, orechy a citrusové plody, ryby a morské plody, pričom zastúpenie sa mení s vekom (**Havličeková et al., 2008**).

Mango (*Mangifera indica*) – alergia sa väčšinou prejavuje orálnym syndrómom. Popisujú sa časté kontaktné alergie u turistov v exotických krajinách, ktorí manipulujú s ovocím (krájanie, porcovanie), zatiaľ čo domáce obyvateľstvo je bez reakcií.

Hruška (*Pyrus communis*) – alergia sa vyskytuje najmä u pacientov s peľovou inhalačnou alergiou. Skrížené reakcie sú časté s jablkom a broskyňou.

Ananás (*Ananas comosus*) – šťava obsahuje vazoaktívne amíny, ktoré môžu spôsobovať symptómy alergickej reakcie. Nebezpečné pre alergikov sú rozličné dropsy a „mixy“ s ananášovou zložkou určené na chudnutie.

Slivka (*Prunus domestica*) – vyskytuje sa vo viac ako 2 000 varietách vo všetkých oblastiach. Slivovica – vonku známa i ako „plum brandy“ môže u alergikov tiež spôsobiť reakciu. Obyčajne ňou býva orálny alergický syndróm. Skrížené reakcie bývajú s broskyňou a marhuľou.

Jahoda (*Fragaria vesca*) – je častou príčinou alergických reakcií, prejavujúcich sa najmä u detí, obyčajne na koži – žihľavka (**Pružinec, 2002**). Najčastejšími prejavmi alergie na jahody sú orálny alergický syndróm a žihľavka. V jahodách bol objavený veľmi podobný alergén, ako je v čeladi brezovité (*Betulaceae*), čo potvrdzuje ich príbuznosť. Reakcie po jahodách môžu byť ale taktiež spôsobené uvoľnením histamínu (www.bez-alergie.cz).

Avokádo (*Persea americana*) – alergické prejavy bývajú obyčajne kožné – žihľavka a ekzém – najmä u pacientov s peľovou alergiou. Avokádo obsahuje vazoaktívne amíny, ktoré môžu spôsobiť symptómy ako alergická reakcia.

Cesnak (*Allium sativum*) a cibuľa (*Allium cepa*) – alergické reakcie spôsobujú zriedkavo. Obsahujú éterické oleje a dráždidlá, ktoré môžu spôsobiť nealergické tráviace ťažkosti.

Paradajka (*Lycopersicon lycopersicum*) – patrí medzi časté alergizujúce potraviny. Najčastejšími reakciami sú kožné – žihľavka a ekzém. Alergickú reakciu spúšťajú najmä surové paradajky, ale výnimkou nie sú ani tepelne upravené – omáčky, kečupy a pod.. Niektoré zložky paradajok – tryptamín, tyramín, a najmä serotonín, vyvolávajú pseudoalergické reakcie.

Uhorka (*Cucumis sativus*) – alergické reakcie na samotnú uhorku nebývajú časté. Nakladané obsahujú v roztoku koreniny, kyseliny a konzervačné látky, ktoré obyčajne bývajú príčinou alergických reakcií.

Zemiak (*Solanum tuberosum*) – pochádza zo Strednej a Južnej Ameriky, do Európy sa dostal začiatkom 16. storočia. Alergiu spôsobuje zriedkavo. Skrížené reakcie sa popisujú s jablkom a mrkvou. Výrobky zo zemiakov – múčka a škrob – nie sú alergénmi.

Čierne korenie (*Piper nigrum*) – popisujú sa alergické reakcie najmä u pacientov alergických na zeler.

Estragón (*Artemisia dracuncululus*) – odroda paliny – známeho inhalačného alergénu. Pridáva sa do omáčok, zaváranín a horčice pre charakteristickú vôňu. Nebezpečná je pre pacientov s alergiou na peľ paliny.

Kakao (*Theobroma cacao*) – rastlina známa viac ako 4 000 rokov, do Európy sa dostalo niekedy v 17. storočí. Kakao a čokoláda je nezriedkavým potravinovým alergénom, najmä u detí. Kakao však môže vyvolať i pseudoalergickú reakciu priamym uvoľnením aktívnych látok. Čokoládové výrobky sú nebezpečné pre alergikov aj obsahom často nedeklarovaných zložiek. Namiesto kakaového masla niektorí výrobcovia čokolády používajú olej sójový, palmový, kukuričný alebo z iných olejnatých semien.

1.11 Skrížená reaktivita potravinových alergénov

Podľa **Ferenčíka et al. (2006)** je skrížená reakcia (cross reaction) schopnosť protilátok, ktorých tvorbu vyvolal určitý antigén, reagovať aj s iným antigénom, ktorý má podobné alebo príbuzné antigénové determinanty (epitopy).

Gamlinová (2003) uvádza, že peľ v mnohých prípadoch orálneho alergického syndrómu predstavujú hlavný alergén. Veľmi častým alergénom je peľ brezy. Potravin rastlinného pôvodu, ktoré skrížene reagujú s peľom brezy, je mnoho, od jablka a čerešne počnúc a špenátom alebo mrkvou končiac. Dlhý zoznam potravín rastlinného pôvodu, spôsobujúcich skrížené reakcie, sa vzťahuje na peľ paliny (zeler, mrkva, jablko, koreniny, melón, rumanček) a peľ starčeka (melón, rumanček, banány, slnečnicové semená).

Podľa **Ferenčíka et al. (2004)** rôzne druhy ovocia vyvolávajú alergie najmä u detí. Relatívne často býva alergia na jablká, broskyne, jahody a na niektoré citrusové plody. Medzi citrusovými plodmi je skrížená reakcia. To znamená, že ak je niekto alergický na pomaranč, bude alergický aj na mandarínku alebo grapefruit. Skrížené reakcie sa pozorujú aj medzi niektorými peľovými a ovocnými alergénmi, napr. pacienti s alergiou

na peľ brezy sú často alergickí na marhule a čerešne. Z jednotlivých druhov zeleniny sa alergické obtiaže vyskytujú najmä po konzumácii rajčín a zeleru.

Podľa **Ettlerovej (www.alergie.cz)** skrížená alergia vzniká na základe podobnosti alergénov. To znamená, že musí byť významná zhoda (väčšinou väčšia ako 70 %) v sekvencii aminokyselín alergénov rôznych druhov potravín, prípadne potraviny a inhalačného alergénu (peľ, roztoče, latex). V dôsledku toho protilátky IgE namierené proti jednému alergénu reagujú takisto s druhým alergénom, ktorý je obsiahnutý v inej potravine druhovo príbuznej, ale i veľmi vzdialenej. Najčastejšia skrížená alergia medzi potravinami a inhalačným alergénom je skrížená alergia s peľom, pri ktorej dochádza primárne k tvorbe IgE protilátok proti peľu a ku klinickým prejavom peľovej alergie a často až po rokoch sa začne objavovať skrížená potravinová alergia. Znalosť skrížených reakcií je užitočná v manažmente potravinovej alergie. Ak zistíme alergiu na peľ, cielene pátrame po alergii na zeler, jablko, orechy atď. Ak zistíme alergiu na broskyne, pátrame po alergii na ostatné kôstkoviny: čerešne, slivky, marhule. Ak máme chorého alergického na avokádo, pátrame po alergii na latex, atď.

Ferenčík et al. (2004) uvádza, že najčastejšími inhalačnými alergénmi sú pele mnohých rastlín. Niektoré z nich sa v posledných rokoch objavili na úplne netradičných miestach. Napr. v oblasti Bratislavskej Petržalky sa na neudržiavaných plochách zrazu objavili buriny, ktoré sa tu predtým nevyskytovali, a ktoré pochádzajú z Afriky. Ich pele predstavujú pre populáciu nové alergény, s ktorými sa väčšina nemohla predtým stretnúť. Dá sa predpokladať, že semená týchto rastlín sa z Afriky preniesli vzdušnými prúdmi. Medzi jednotlivými alergénmi existujú skrížené reakcie. To znamená, že ak je jedinec alergický na určitý alergén, bude alergický aj na všetky ostatné alergény, s ktorými tento alergén krížovo reaguje. To platí aj pre nové alergény, ktoré sa v danej oblasti objavujú.

Najčastejšími vonkajšími inhalačnými alergénmi podľa autora sú:

a) pele rôznych stromov, ako jelša (*Alnus glutinosa*, *Alnus incana*), breza (*Betula pendula*), lieska (*Corylus avellana*), oliva (*Olea europea*) alebo dub (*Quercus*). Peľ topoľov, ktorému mnohí prisudzujú funkciu alergénu, je z tohto hľadiska prakticky neškodný. Jeho biele páperie môže byť nepríjemné len z estetického hľadiska.

b) pele tráv patria medzi najrozšírenejšie. Kvitnú približne polovicu roka a preto aj ich pele sa v ovzduší nachádzajú dlhú dobu. Patrí k nim raž siata (*Secale cereale*), timotejka lúčna (*Phleum pratense*), psinček biely (*Agrostis alba*), lipnica lúčna (*Poa pratensis*), psiarka

lúčna (*Alopecurus pratensis*), pýr plazivý (*Elytrigia repens*), mätoh trváci (*Lolium parrine*) a ďalšie.

c) pele burín a bylín, ako palina pravá (*Artemisia vulgaris*), ambrózia (*Ambrosia artemisiifolia*), pŕhľava dvojdomá (*Urtica dioica*), púpava lekárska (*Taraxacum officinale*), múrovník (*Parietaria judaica*), mrlík biely (*Chenopodium album*), skorocel kopijovitý (*Plantago lanceolata*).

Špičák – Hrubíško (2005) ako alergénne pele uvádzajú pele nasledujúcich rastlín a stromov:

Dreviny: breza, jelša, lieska, hrab, dub, buk, gaštan jedlý, oliva, jaseň, vtáčí zob, cyprus, topoľ, vŕba, javor, baza, pagaštan, orech, platan, brest, lipa.

Trávy a obilniny: mätonoh, timotejka, psiarka, psinček, raž, kostrava, medúnok, lipnica, pýr, reznáčka, stoklas, metlička, kukurica.

Byliny: palina, ambrózia, zlatobyľ, púpava, slnečnica, mrlík, loboda, láskavec, žihľava, skorocel, múrovník, štiav, repka.

Biologicky príbuzné druhy potravín vyvolávajú alergické prejavy vzhľadom na obsah rovnakého alebo biochemicky veľmi príbuzného (homológneho) antigénu väčšinou bielkovinového charakteru. Častá je skrížená reakcia medzi plodmi alebo inými časťami – koreňmi, vňaťou, ...) príbuzných rastlín a peľom príbuzných, ale aj nepríbuzných rastlín (**Hrubíško et al., 2003**).

Tabuľka 2 Prehľad najčastejších krížovo reagujúcich potravín a niektorých druhov peľu
(Hrubiško et al., 2003)

Potravina	Skrížená reakcia
arašid	všetky bôbovité (strukoviny), sčasti lieskový a vlašský orech, mandle
banán	ananás, avokádo, broskyňa, cukina, kiwi, melón, papája, paradajka, orechy, tekvica, zemiaky, peľ brezy a paliny, latex
broskyňa	avokádo, banán, guajava, marhuľa, papája, slivka, latex, peľ drevín, tráv, bylín (profilín),
cesnak	cibuľa, pažitka, pór, špargľa
jablko	mrkva, zemiaky, peľ brezy
kiwi	ananás, avokádo, banán, broskyňa, mango, papája, paradajka, vlašský orech, peľ brezy, paliny, latex
hrach	arašidy, bôb, fazuľa, fenikel, lékorica, sója, šošovica, živice
kravské mlieko	kozie, kobyľie, ovčie mlieko, prípravky dojčenskej výživy
krevelty	kalamár, krab, rak, ustrica...roztoče
med	kontaminácia peľom (peľové cukríky, propolisové prípravky...)
mrkva	ananás, aníz, avokádo, jablko, pšenica, ryža, zeler, zemiaky, peľ brezy
obilniny	jačmeň, kukurica, ovos, pšenica, ryža, peľ tráv
treska	losos, makrela, tuniak a iné morské ryby
ryža	jačmeň, kukurica, ovos, pšenica, raž, peľ lípnicovitých tráv a obilnín
vlašský orech	lieskový orech, makadamový orech, mandle, pekany a iné orechy
vajce	bielok, žltok, ovalbumín, ovomukoid, lyzozým, inhalované antigény vtákov – perie, výlučky...

1.12 Diagnostika alergických ochorení

Diagnostika patrí do rúk špecialistu alergológa a klinického imunológa s kooperáciou iných odborníkov (**Štefanovič, 2004**).

V praxi sa pri podozrení na potravinovú alergiu postupuje nasledujúcim spôsobom:

1. najprv sa získa dokonalá alergologická anamnéza,
2. prevádzajú sa kožné testy, pri nich sa sleduje vznik kožnej reakcie po aplikácií hlavných potravinových alergénov,
3. vyšetruje sa hladina celkového IgE, prípadne hladiny protilátok typu IgE špecifických pre určitú potravinu,
4. v prípade pozitívnych testov v bode 3 sa prevádza expozičný test a to vo forme: DBPCFC (dvojitá slepá skúška vystavenia pacienta podozrivej potravine kontrolovaná placebo – neúčinnou látkou), princíp testu spočíva v tom, že ani pacient, ani lekár nevie, či pacient dostal daný alergén, alebo placebo,
5. eliminačné diéty,
6. prevádzajú sa testy priepustnosti črevnej sliznice, pri ktorých sa sleduje pomer vstrebávania veľkých a malých molekúl cukru (napr. laktulózy a manitolu),
7. prevádzajú sa biopsie (odber) sliznice tenkého čreva, ktorá sa vyšetruje svetelným i elektrónovým mikroskopom (**Kvasničková, 1998**).

V roku 1989 sa prvý raz publikovali odporúčania Európskej akadémie pre alergológiu a klinickú imunológiu (EAACI) zaoberajúce sa kožnými testami (Position Paper), ktorých zmyslom bolo zjednotiť testovanie na rôznych pracoviskách v Európe tak, aby výsledky jednotlivých pracovísk boli navzájom porovnateľné (**Dreborg, 1989**).

Aktuálne platný záväzný postup pri realizácii a interpretácii kožných testov upravuje materiál EAACI z roku 1995 (**Dreborg, Niggemann, 1995**).

Kožné testy sú nevyhnutným doplnkom každého základného alergologického vyšetrenia. Objav dôkazu alergickej precitlivelosti kožným testom patrí Charleovi Blackleyovi už v roku 1865, neskôr techniku zdokonalil Grant, Lewis, Pepys a ďalší, ktorí zaviedli do použitia prick (žihadlo) testy. V súčasnosti je záväzný štandardný postup, zavedený Európskou akadémiou pre alergológiu a klinickú imunológiu (**Pružinec, 2002**).

Anamnéza (podrobný opis príznakov po požití podozrivej potravy, závažnosť, rýchlosť a časová súvislosť reakcie s jedlom, druh a množstvo požitej potravy, počet nežiaducich reakcií) je základom diagnózy. Pri diagnostike potravinovej alergie je veľmi

užitočný denník požitej potravy (presný denný záznam požitej potravy a tekutín s detailným zoznamom zložiek potravy aj aditív podľa obalu potravín) a výskyt ťažkostí (čas a intenzita) počas 2 – 4 týždňov. Fyzikálne vyšetrenie všetkých orgánových systémov môže odhaliť aj postihnutie iného systému, ako sú hlavné prejavy reakcií po požití inkriminovanej potravy - bronchiálna obštrukcia pri atopickom ekzéme, žihľavke **(Kayserová, 2004)**.

Prick – test, vpichový test (SPT) – najpoužívanejší diagnostický postup. Podmienkou je použitie štandardizovaných roztokov alergénov a realizácia pozitívnej a negatívnej kontroly. SPT má pri diagnostike potravinovej alergie vysokú negatívnu (>90 %) ale nízku pozitívnu (<50 %) prediktívnu výpovednú hodnotu. SPT je teda vhodný na vylúčenie potravinovej alergie sprostredkovanej IgE, ale nie na jej potvrdenie. Epikutánný test (APT – Atopy Patch Test) je výťažný najmä v diferenciálnej diagnostike potravinovej alergie u detí s atopickou dermatitídou. Senzitivnosť pre oneskorenú fázu má vysokú pozitívnu prediktívnu výpoveď: 94 – 95 % pre kravské mlieko, vajcový bielok, pšenicu (spolu so špecifickými IgE = 100%). Špecifickosť je 95 % **(Niggeman et al., 2001)**.

Podľa **Helm (2001)** sú vhodné expozičné potravinové testy (otvorené, jednoducho i dvojito zaslepené). Expozičný test pomôže odlíšiť emočné problémy s potravou.

- a) jednoduchý slepý labiálny provokačný test s čerstvou potravou je dostupný v alergologickej ambulancii. Falošne pozitívne reakcie sú zriedkavé. Používa sa na potvrdenie OAS (najmä pri zelere), predchádza DBPCFC. Princípom je priloženie kúska čerstvej (narezanej) potravy (kvapnutie v prípade tekutiny) na dolnú peru a jej ponechanie 15 min. Sleduje sa včasná a oneskorená reakcia.
- b) orálny provokačný test (OPT) sa vykonáva po negatívnom labiálnom teste (počas hospitalizácie) Rozlišuje sa:
 1. jednoduchý otvorený OPT – expozícia inkriminovanému alergénu,
 2. jednoduchý slepý OPT (pacient nevie, či dostáva placebo, alebo inkriminovanú potravu, resp. aditívum),

3. dvojito zaslepený, placebom kontrolovaný OPT (DBPCFC – angl. Double - blind Placebo - controlled food challenge). Je zlatým štandardom vyšetrenia na potravinovú alergiu. Potvrdí imunitnú reakciu (IgE/ nie – IgE) .

Testu predchádza eliminačná diéta (14 dní), pri atopickej dermatitíde 4 týždne, pri gastroenteropatii 3 mesiace, dôležité je vynechanie stálej liečby (napr. antihistaminiká) 6 – 12 hodín pred testom). V priebehu testu sa robí podrobný časový záznam o symptómoch, množstve a intervaloch podanej stravy, frekvencii a opakovaní príznakov. Realizácia testu: iniciálna dávka 25 – 500 mg sa zvyšuje dvojnásobne až do 8 – 10 g sušenej alebo 60 – 100 g normálnej potravy, čo je denný interval primeraný veku. Interval: 15 – 30 min (pri kapsuliach 60 min). Sušená (dehydrovaná) potrava je vhodnejšia ako mrazená alebo varená vzhľadom na možnú zmenu alergénosti (vajce, mäso). Potrava aj placebo (vehiculum sušenej potravy, dextróza, ovocné šťavy, Neocate SHS) sa podávajú v kapsuliach (u malých detí bez kapsúl). Test môže byť falošne negatívny (1,8 – 4,6 %) z rôznych dôvodov: nízka dávka alergénu, navodenie tolerancie (reakcia až po vyššej dávke) alebo strata alergénosti pri príprave. Falošne pozitívny výsledok je zriedkavý (0,5 – 0,9 %). Trvanie testu: 3 dni (sledovanie po dosiahnutí maximálnej dávky). Za pozitívny výsledok sa pokladá jeden z nasledujúcich príznakov: urtikária, angioedém, bronchiálna obštrukcia, vracanie, hnačka, bolesti brucha, šok alebo exacerbácia ekzému. Včasná reakcia sa prejaví príznakmi do 120 minút, neskorá reakcia vždy po 2 hodinách. Negatívny DBPCFC sa potvrdí vždy otvoreným testom (konzumácia normálnej porcie inkriminovanej potraviny). Až 45 % pozitívnych reakcií sa zjaví po požití množstva menšieho ako 500 mg.

Prvým krokom v liečbe alergií (www.liecive.herb.sk) je vyhýbať sa kontaktu s alergénmi, ktoré ochorenie vyvolávajú. Tento postup sa dá využiť v prípade alergií na niektoré druhy potravín alebo liekov, ak je však spúšťačov viac alebo sa šíria ovzduším, je to veľmi ťažké, v niektorých prípadoch priam nemožné. K nefarmakologickým riešeniam na zmiernenie príznakov alergií patrí zmena prostredia, postupy na zmiernenie alergií a percentuálny podiel pacientov, ktorí tieto riešenia aplikujú uvádza tabuľka 3.

Tabuľka 3 Nefarmakologické riešenia na zmiernenie príznakov alergií
(www.liecive.herb.sk)

Postup	Percentuálny podiel pacientov
Zvlhčovač vzduchu/čistička vzduchu	31
Výmena nábytku	30
Odstránenie mäkkých častí nábytku	29
Zákaz fajčenia v interiéri	8
Odstránenie kobercov	7
Použitie špeciálnych hygienických produktov	7

1.13 Alergia na zeler (*Apium graveolens* L.)

1.13.1 Botanická charakteristika – zeler

Zeler voňavý (*Apium graveolens* L.), čeľaď mrkvovité *Apiaceae* (syn.: *Daucaceae*, *Umbelliferae*). Rastlina pestovaná pre hľuzovitý koreň, dolné listy perovito zložené, horné dlaňovito 3 – početné, lesklé, okolíky drobné, rastlina dvojročná, 30 – 50 cm vysoká, VII – VIII, rastlina medicínálna (**Martinovský et al., 1987**).

Obrázok 1 Zeler voňavý (*Apium graveolens*)

Dvojročná, až 80 cm vysoká, silne aromatická bylina s guľatou (záhradné formy) alebo vretenovitou koreňovou hlavou. Stonka plná, ryhovaná. Listy jednoducho až dvojito strihané, segmenty a segmentíky obrátene vajcovité, na báze klinovité, laločnaté, na okraji ostro pílkovité. Stonkové listy ± protistočné, krátko pošváté, ± sediace, trojlaločnaté až trojpočetné, horné klinovité, trojlaločné alebo trojpočetné, celistvookrajové. Zložený okolík so 6 – 12 okolíčkami.



Obal a obalčky chýbajú. Lupienky drobné, belavé. Plody široko vajcovité s 5 rebrami. Chromozómy: $2n=22$, pestované ÚKSUP, Bratislava (Biológia, pôvod, fytoecológia. Hemikryptofyt. Kvitnutie jún – august. Pochádza zo Stredomoria. Pestovaný druh. Vzácné zdivočuje a vyskytuje sa v spoločenstvách radu *Sisymbrietalia*.

Úžitkovosť: Všeobecne pestovaná zelenina v záhradách a na poliach, a to buď pre koreňovú hlavu (*Apium graveolens L. var. rapaceum* (Miller) DC.) alebo pre jedlé listové stopky (*A. graveolens L. var. dulce* (Miller) Pers.) alebo pre kučeravé listy (*A. graveolens L. var. secalinum* Alef.) (Bertová et al., 1984).

1.13.2 História pestovania zeleru a jeho využitie v potravinárstve

Vo vzťahu k histórii zeleru, údaje o prvej zmienke použitia zeleru sú rôzne. Podľa internetového portálu www.allallergy.net sa zeler spomína po prvýkrát v roku 1 200 pred n.l., podľa portálu www.drugs.com sa zeler používal už v roku 450 pred n.l..

Zeler sa prvýkrát spomína okolo roku 1200 pred n.l.. V tradičnej orientálnej medicíne sa používal na liečenie hypertenzie. Je dobrým zdrojom draslíka, pomáha udržiavať zdravý krvný tlak. Takisto napomáha činnosti obličiek. Obsahuje 3 n - butyl ftalát, ktorý účinkuje ako sedatívum a znižuje krvný tlak. Čaj pripravený zo semien pomáha chorým na dnu, semená tiež obsahujú olej, ktorý je prirodzeným upokojujúcim prostriedkom. (www.allallergy.net).

Zeler pochádza z divokej rastliny rastúcej v slaných močiaroch v blízkosti Stredozemného mora okolo 450 rokov pred n.l. Gréci ho často používali na výrobu vína zvaného „selinites“. Toto slúžilo ako ocenenie na počiatkových atletických hrách, skoro ako vavrínové listy alebo olivové vetvičky. V stredoveku Európania zeler kultivovali. Od tých čias sa táto rastlina celosvetovo rozšírila rovnako ako potravina i liečivo (www.drugs.com).

Zeler sa konzumuje v čerstvom stave alebo ako varená zelenina. Zelerové korenie sa používa v rôznych spracovaných potravinách ako sú koreniace zmesi, polievky, vývary a šalátové dresingy. Podľa databázy nasledujúce potraviny môžu obsahovať zeler: koreniny, zmesi korenín, bylinné a koreninové zmesi, soľ s zelerom a bylinkami, slané pečivo, polievky, omáčky, horčica, majonézy, šalátové dresingy, mäsové suroviny, slané koláče, konvenčné potraviny, klobásy, salámy, konvenčné potraviny na báze mäsa a rýb, konzervované potraviny (www.foodallergens.ifr.ac.uk).

Koreň aj stvol zeleru voňavého (*Apium graveolens dulce*) sa konzumoval už pred mnohými tisícročiami v Egypte (1 200 pred n.l.). Pre svoju výraznú chuť a vôňu je čerstvý súčasťou šalátov, varený súčasťou polievok a omáčok, sušený súčasťou korenia typu Vegeta. V orientálnej medicíne sa používal na liečbu hypertenzie. Obsahuje železo, limonín, vitamín B₂, salicylát sodný, nitrity a psoralény (fytoalexín), ktoré môžu spôsobiť po zjedení fotosenzitívnosť kože. Jeho dva hlavné alergény Api g 1, Api g 4 sa líšia najmä odolnosťou proti teplu. Termolabilný alergén Api g 1 je homológny s alergénom brezy Bet v 1, termostabilný Api g 4 je príbuzný minimálne trom alergénom paliny (syndróm palina – karotka – zeler – korenie). Spôsobuje celé spektrum alergických reakcií od rinokonjunktivitídy po anafylaktický šok (**Hrubíško et al., 2003**).

Zeler (*Apium graveolens*) je obľúbená súčasť šalátov, polievok, omáčok a je častou príčinou potravinových alergických reakcií. Okrem prejavov žihľavky, ktorá býva najčastejšou klinickou reakciou, sú po konzumácii zeleru nezriedka popisované ťažké anafylaktické reakcie. Spolu s arašidmi patrí medzi najčastejšie príčiny smrti u pacientov s alergiou na potraviny. Surový zeler je častejšou príčinou alergie ako varený. Častý výskyt potravinovej alergickej reakcie po konzumácii zeleru majú pacienti alergickí na peľ paliny. Skrížená reaktivita je aj u mrkvy a korenín. Alergici si musia dávať pozor na nedeklarované pridávanie do polievok ako sušené korenie a do majonézových šalátov – varený a pomletý zeler ako lacná náhrada surovín do šalátov - napr. rybací alebo parížsky (**Pružinec, 2002**).

1.14 Alergénne vlastnosti zeleru a klinické prejavy alergie na zeler

Do čeľade mrkvovitých – *Daucaceae*, syn.: *Apiaceae*, *Umbelliferae*) patrí všetka koreňová zelenina (mrkva, paštrnák, petržlen, zeler) a viaceré druhy korenia (aníz, fenikel, koriander, kôpor, ligurček, rasca, ale aj vňať samotnej koreňovej zeleniny). Koreňová zelenina obsahuje dva hlavné druhy alergénov: termolabilný, krížovo reagujúci s drevinovým peľovým alergénom Bet v 1 a termostabilný, krížovo reagujúci s alergénom astrovitých bylín (najmä Art v 1 paliny, tzv. syndróm palina – karotka – zeler – korenie). Najčastejšou formou alergie po koreňovej zelenine je orálny alergický syndróm (OAS) po konzumácii čerstvých koreňov, sú však možné všetky ostatné prejavy IgE – precitlivenosti (urtikária, angioedém, rinitída, astma, anafylaxia). Závažné prejavy môžu

najmä u polinotikov vzniknúť pri šúpaní, resp. strúhaní koreňov. Pri priamom kontakte kože s čerstvou zeleninou vzniká u vnímavých jedincov kontaktná dermatitída. Vzhľadom na obsah psoralénov (termostabilných fytoalexínov) sú pomerne časté aj prejavy fytofotodermatitídy (**Hrubíško et al., 2003**).

Podľa internetového portálu **www.ehow.com** prvým symptómom alergie na zeler je zvracanie a hnačka. Vracanie a hnačka sú dva spôsoby ako vyčistiť telo od toxínov a sú bežné s alergickými reakciami. Ak tieto symptómy pretrvávajú dlhší čas, sú potrebné konzultácie s lekárom, aby telo nebolo dehydrované. Vyrážka na koži je ďalším symptómom. Kožné vyrážky môžu alebo nie sú bolestivé a sú bežným symptómom pre alergickú reakciu. Môžu to byť vyrážky, pupence, opary, ekzémy, ktoré môžu svrbieť a byť horúce na dotyk. Hoci svrbenie sa môže vyskytovať kdekoľvek na pokožke, pre alergiu na zeler je najviac bežné svrbenie na tvári a krku. Lekár musí byť kontaktovaný pri každom svrbení na tvári alebo krku nakoľko tento prejav môže ľahko stiahnuť dýchacie cesty a spôsobiť ťažkosti pri dýchaní.

Problematické dýchanie - dýchavičnosť sa môže vyskytovať pri každej alergickej reakcii, ale sťažené dýchanie sa môže vyskytovať, ak opuchne tvár a hrtan. Ako pri ostatných alergických reakciách pochádzajúcich z potravín, ak je exponovaný zelerom niekto, kto je alergický na zeler, môže rýchlo opuchnúť. Opuch môže zovrieť dýchacie cesty a obmedziť schopnosť dýchať. V tejto situácii musí byť vyhľadané lekárske ošetrovanie.

Pokles krvného tlaku – keď krvný tlak poklesne, môžu prísť závrate alebo nevoľnosť. Aj to môže byť prejav symptómov, ak je podozrenie na alergiu zo zeleru.

Anafylaktický šok je najnebezpečnejší symptóm alergie na zeler. Je bežný pre potraviny a bodnutia hmyzom a môže byť smrteľný.

Alergia na koreň zeleru, člena rodu *Apiaceae*, patrí k najviac frekventovaným peľovým potravinovým alergiám v niektorých európskych krajinách ako Švajčiarsko, Francúzsko alebo Nemecko. Zeler je konzumovaný ako surová alebo varená zelenina. Vážne alergické reakcie na zeler sú pozorované hlavne po konzume surového zeleru, ale môžu sa tiež vyskytnúť po príjme potravín obsahujúcich technologicky spracované alebo ohriate zelerové buľvy. Toto je obzvlášť dôležité potom, čo sa sušený prášok zo zelerových koreňov používa ako lacná koreniaca prísada vo veľkom množstve spracovaných potravín ako sú koreniace zmesi, polievky, vývary a šalátové dressingy.

V súčasných štúdiách o potravinách bola alergenicita zelerového korenia preukázaná u pacientov so známou alergiou na surový zeler. Teda komerčne používaný zelerový prášok nie je bezpečný pre pacientov, ktorí sú alergickí na surový zeler. Navyše, alergický potenciál zeleru bol trvalý u niektorých pacientov dokonca po extenzívnom tepelnom ošetrení (> 60 min pri teplote 100 °C), čo poukazuje na vysokú tepelnú rezistenciu niektorých zelerových alergénov. Minimálna dávka zistených alergických symptómov (prahová dávka) zatiaľ nebola determinovaná. Avšak u 48 % pacientov podstupujúcich orálny podnet zelerom sa vyvinuli alergické symptómy pri dávke 700 mg. Vo Švajčiarsku okolo 40 % pacientov s potravinovou alergiou sú citliví na zelerovú buľvu a boli zaznamenané ťažké anafylaktické reakcie. Vo Francúzsku, 30 % ťažkých alergických reakcií na potraviny boli, v súlade s anamnézou pacientov, spôsobené zelerom. Na diagnózu alergie na zeler môžu byť vykonané kožné testy alebo môžu byť vyšetrené vzorky krvi. Do 85 % pacientov s alergiou na zeler vykazuje pozitívne výsledky v týchto testoch. Pri použití surového zeleru na kožné testy, 96 % na zeler alergických pacientov majú pozitívny výsledok kožného testu. Pacienti s alergiou na brezu alebo peľ paliny však môžu vykázat pozitívny kožný test/in vitro výsledky na zeler bez toho, aby boli ovplyvnení alergickým symptómom po konzumácii zeleru. Takto pozitívne výsledky testov musia byť interpretované na základe pozitívnej anamnézy a/alebo testov orálnej expozície (www.foodallergens.ifr.ac.uk).

1.15 Metodické postupy vhodné k detekcii potravinových alergénov

1.15.1 Imunoelektroforetické metódy

Elektroforetické metódy sa používajú na separáciu látok, buniek a iných častíc, ktoré majú elektrický náboj. Elektroforéza sa často používa na štúdium bielkovín a nukleových kyselín. Elektroforetické delenie prebieha podľa pohyblivosti makromolekúl v elektrickom poli, ktoré závisí od: veľkosti náboja, sily elektrického poľa, veľkosti a tvaru makromolekúl a podmienok prostredia. Veľkosť náboja molekuly ovplyvňuje stupeň ionizácie, pH a iónová sila. Elektroforetická pohyblivosť je funkciou náboja, ktorý nesie molekula, molekulovej hmotnosti a je závislá od tvaru, čiže konformácie. Touto metódou sa dajú úspešne sledovať interakcie typu nukleová kyselina-proteín, nukleová kyselina-nukleová kyselina a proteín-proteín. Elektroforéza prebieha v prostredí voľného

elektrolytu, alebo v pórovitých nosičoch, ktoré sú nasýtené elektrolytom. Ako nosiče sa používajú škrob, dextran, agaróza a polyakrylamidové gély. V súčasnosti sa pri elektroforetickej separácii najviac používajú agarózové a polyakrylamidové gély. Elektroforéza v polyakrylamidovom géle (PAGE) sa využíva hlavne pri štúdiu proteínov a v malej miere aj nukleových kyselín s menšou molekulovou hmotnosťou. Polyakrylamidový gél bol pri elektroforéze prvý krát použitý v roku 1959 *Raimondom a Weintraubom*. Popularita tohto nosiča je vďaka jeho priehľadnosti, mechanickej stabilite, chemickej inertnosti, stabilite v širokom rozsahu hodnôt pH a jeho nerozpustnosti vo väčšine rozpúšťadiel používajúcich sa pri elektroforéze. Gél môže byť spoľahlivo a reprodukovateľne pripravený z analyticky čistých východných materiálov, ktorých vzájomný pomer má rozhodujúci vplyv na hustotu a priemernú veľkosť pórov gélu. Koncentrácia akrylamidu býva v rozsahu od 3 do 30 %, čo umožňuje separovať látky od 102 do 106 g/mol, čo odpovedá peptidom s veľkosťou rádovo od jednej aminokyseliny do 102 prípadne až 103 aminokyselinových zvyškov. Na štúdium nukleových kyselín sa využíva agarózová elektroforéza. Plazmidová DNA sa v bunkách nachádza v početných topologických formách. Vo fyziologických podmienkach sa v dôsledku disociácie fosfátových skupín správa ako polyanión a pri elektroforéze putuje ku kladnej elektróde. V danom prostredí má zmes topoizomérov rovnaký náboj a preto jediným faktorom, ktorý ovplyvňuje pohyblivosť topoizomérov je priestorová konformácia. Klasická gélová elektroforéza cirkulárnych molekúl je obmedzená deliacou schopnosťou gélu. Jednotlivé topoizoméry s molekulovou hmotnosťou menšou ako 7 kbp (kilobazopár) sa pozorujú pri 1 % agarózovom géli ako jednotlivé pásy (**Sedlák et al., 2007**).

Dvojrozmerná elektroforéza – výhodná pre analýzu zmesi antigénov. Uskutočňuje sa v dvoch rozmeroch. Najprv sa v agarózovom alebo polyakrylamidovom géli rozdelí zmes antigénov. Môže sa použiť i izoelektrická fokusácia alebo izotachoforéza. Druhá elektroforéza sa robí kolmo na smer delenia antigénov v géli obsahujúcom polyspecifickú protilátku. Antigény migrujúce v géli vytvárajú s protilátkami v zónach ekvivalencie široké precipitačné rakety. Ich umiestenie v elektroforeografe charakterizuje druh antigénu (**Shungu et al., 2007**).

Dvojrozmerná elektroforéza (2D elektroforéza) eliminuje určité nedostatky jednoduchej elektroforézy ako je napr.: nedostatočná deliaca schopnosť, vzájomný prekryv topoizomérov vplyvom štruktúrnych prechodov, komigráciu topologických neekvivalentov

a maskovanie lineárnej DNA. Táto metóda umožňuje vypočítať niektoré topologické a termodynamické parametre, napr. zmenu Wr a zodpovedajúci počet párov báz, ktoré prešli na alternatívnu štruktúru. Pri 2D elektroforéze sa v prvom smere molekuly rozdelia na základe kompaktného zbalenia a v druhom smere, (ktorý je kolmý na prvý), dochádza k separácii na základe konformačných zmien spôsobených prítomnosťou interkalátora. Význam interkalátorov pri 2D elektroforéze spočíva v relaxácii torzného pnutia indukovaného vplyvom superhelikálneho vinutia. Pri kontrolnej dvojrozsmernej elektroforéze, keď sa v druhom smere nemenia podmienky prvého smeru, získame topoizoméry v diagonálnom usporiadaní (Sedlák et al., 2007).

1.15.2 Imunologické metódy

Základná sendvičová ELISA metóda využíva vysoko špecifické protilátky, ktoré sú adsorbované alebo „potiahnuté“ na plastické mikrotitračné platničky. Imobilizované protilátky slúžia na špecifické zachytenie ich zodpovedajúcich antigénov ako sú potravinové alergény, ktoré sú prítomné vo vzorkách. Po odstránení nenašielaného materiálu vymytím sú zachytené antigény zistené pomocou enzým-konjugát protilátky (detegujúca protilátka). Nasledujúce prídanie roztoku obsahujúceho chromogénny substrát vyrovná úroveň farebného produktu vytvoreného naviazaním. Enzým spojený s protilátkami je meraný spektrofotometricky pomocou ELISA readera pri zodpovedajúcej vlnovej dĺžke. Intenzita farebných zmien je približne úmerná koncentrácii alergénu vo vzorke, t.j. čím intenzívnejšie sú farebné zmeny, tým väčšie množstvo alergénu sa vo vzorke nachádza (Xi et al., 2010).

ELISA (enzyme – linked immunosorbent assay) – typ enzýmovej imunoanalýzy (enzýmová imunosorbentová analýza). Ide o imunochemickú analytickú metódu, pomocou ktorej možno výhodne kvantitatívne určiť aj veľmi malé množstvá antigénov, hapténov alebo protilátok nachádzajúcich sa v zložitých zmesiach. Jedna z dvojice reagujúcich látok (protilátka/antigén) sa pritom označí enzýmom a imobilizuje sa nadviazaním na tuhý nosič (zvyčajne stena jamky v mikrotitračnej platni alebo stena skúmavky, polystyrénová guľôčka a pod.). Po ich reakcii sa množstvo vzniknutých imunokomplexov určí prídanim substrátu, ktorý reaguje s prítomným enzýmom farebnou reakciou (Ferenčík et al., 2006).

Na detekciu alergénov v potravinách sa v súčasnosti využívajú ELISA testy, ktoré však môžu pozitívne detekovať okrem zeleru i ďalšie príbuzné druhy z čeľade mrkvovité

ako sú aníz, fenikel, koriander, kôpor, kumín, ligurček a rasca, zároveň i petržlen, paštrnák, mrkva. Podľa **Sandberga et al. (2009)** (www.slv.se), ELISA testy pozitívne detekovali okrem zeleru i obsah petržlenu v koreniacej zmesi s cesnakom a bylinkami, ďalej obsah mrkvy a paštrnáku v instantnej polievke s brokolicou a pórom, petržlenu v bylinkovej soli, mrkvy a paštrnáku vo vegetariánskej strave, mrkvy v sladko – kyslej omáčke, mrkvy, kapusty a paštrnáku v mäsovom vývare so zeleninou a mrkvy v detskej výžive. Vo väčšine vzorkách, práve mrkva bola dôležitou súčasťou, ktorá krížovo reagovala s protilátkou vzorky, taktiež vzorky reagovali i s paštrnákom a petržlenom.

1.15.3 Polymerázová reťazová reakcia – DNA metódy

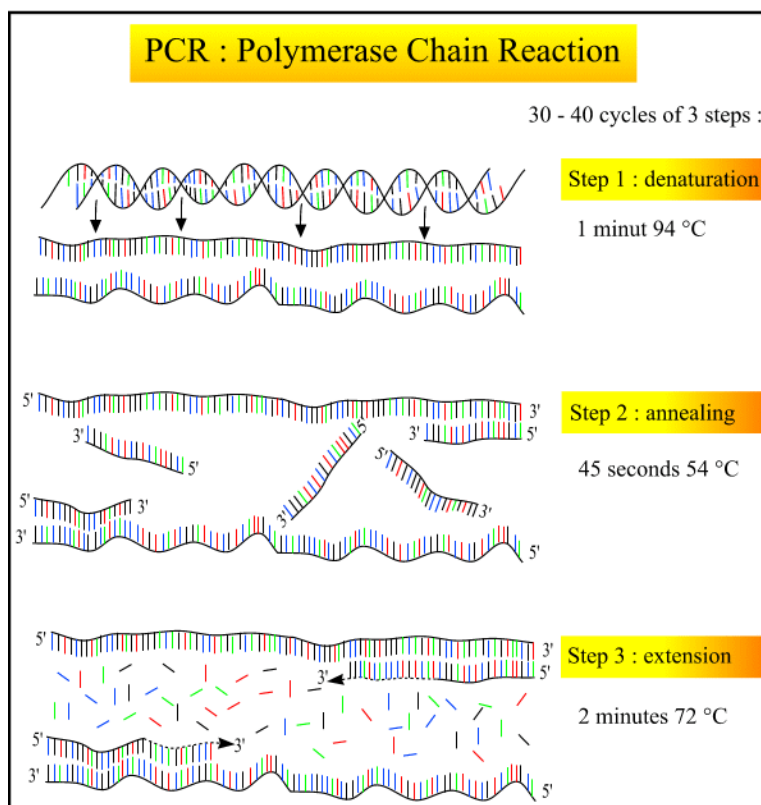
PCR (*polymerase chain reaction*, polymerázová reťazová reakcia) je metóda na rozmnoženie (amplifikáciu) definovaného úseku DNA v podmienkach *in vitro*. Pomocou PCR je možné vytvoriť desiatky miliónov kópií úseku DNA v priebehu niekoľkých desiatok minút. PCR pozostáva z opakujúcich sa cyklov, z ktorých každý sa skladá z nasledujúcich krokov prebiehajúcich pri definovanej teplote:

- 1) rozpletenie (denaturácia) DNA, t.j. konverzia dvojvláknovej DNA na jednovláknovú pri teplote 94 °C – 95 °C,
- 2) priľnutie (annealing) oligonukleotidových prajmerov k homologickým úsekom DNA pri teplote 37 – 70 °C,
- 3) dosytentizovanie (polymerizácia) druhého vlákna DNA z nukleotidov pomocou termostabilnej DNA polymerázy pri teplote 60 – 72 °C (**Kuchta, 2005a**).

Klasická PCR - používa sa na kvalitatívnu analýzu zložiek potravín. Preparát DNA izolovanej zo vzorky potraviny sa pridá do reakčnej zmesi, obsahujúcej v tlmivom roztoku deoxyribonukleotidy, horečnaté katióny, oligonukleotidové prajmery a termostabilnú DNA polymerázu. Reakčná vzorka sa inkubuje v PCR termocykléri s teplotným programom začínajúcim úvodnou denaturáciou, pokračujúcim 35 – 45 cyklami pozostávajúcimi z denaturácie, priľnutia prajmerov a polymerizácie, a končiacim záverečnou polymerizáciou. Produkt PCR sa analyzuje elektroforézou v agarózovom géle, pričom identita fragmentov DNA sa zisťuje na základe ich molekulovej hmotnosti v porovnaní so štandardom. Vzhľadom na vysokú citlivosť uvedenej metódy je potrebné venovať veľkú pozornosť protikontaminačným opatreniam. Súčasným trendom je vyhnúť

sa úplne otváraníu skúmaviek po PCR použitím real-time PCR alebo end-point fluorometrie (Kuchta, 2005b). Princíp PCR a amplifikáciu fragmentu DNA počas PCR reakcie uvádza obrázok 2 a 3.

Obrázok 2 Princíp polymerázovej reťazovej reakcie (www.users.ugent.be)

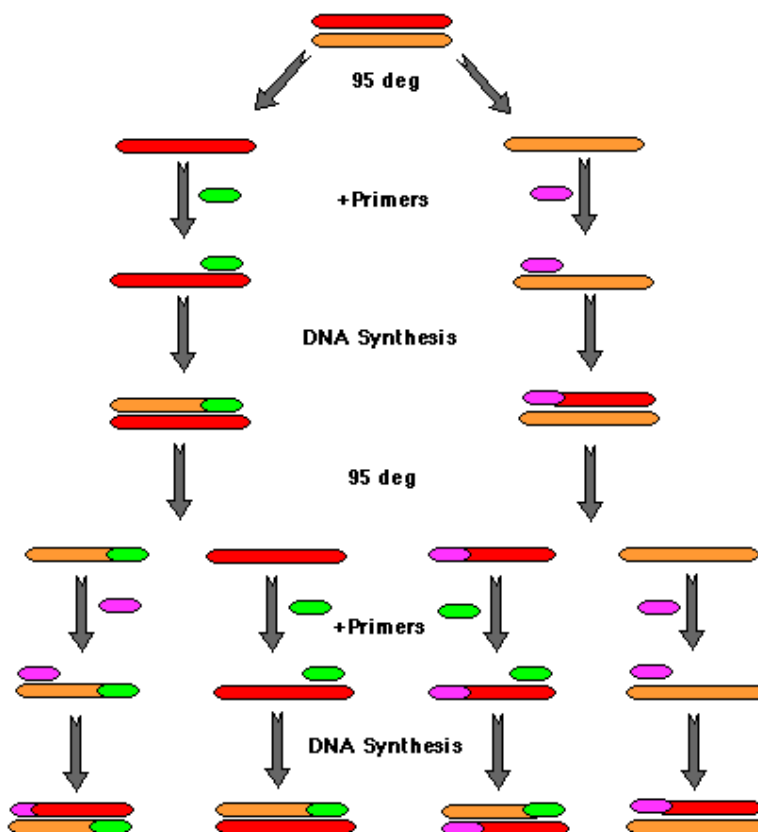


V posledných rokoch sa vo výskume a analytickej praxi čoraz viac používa tzv. real-time PCR, čo je PCR s priebežným monitorovaním fluorescence. Na rozdiel od klasickej, tzv. end-point PCR, sa pri tejto metóde prítomnosť amplifikovaných fragmentov DNA zisťuje na základe nárastu fluorescence počas PCR. Zdrojom fluorescence je komplex DNA s interkalačným farbivom alebo rôzne fluorescenčne označené sondy alebo prajmery. V prípade real-time PCR s farbivom SYBRGreen sa v priebehu PCR nešpecificky sleduje množstvo všetkej DNA vo vzorke a po ukončení PCR sa vykoná analýza amplifikovaných fragmentov DNA na základe stanovenia závislosti fluorescence od teploty (melting curve analysis). Hlavnými výhodami real-time PCR je minimalizácia rizika kontaminácie laboratórneho prostredia amplifikovanými

fragmentmi DNA vďaka uzatvorenosti systému a možnosť kvantifikácie špecifického fragmentu DNA na základe priebehu amplifikačných kriviek (Kuchta, 2005a).

Dovičovičová et al. (2004) overovali spoľahlivosť metódy PCR pri detekcii zeleru v jeho rozličných kultivároch, vo vybraných príbuzných druhoch čelade *Apiaceae*, a v ďalších druhoch zeleniny, pričom PCR sa potvrdila ako vhodná metóda pre stanovenie zeleru, pozitívne reagovali rôzne kultivary zeleru, ostatné vzorky vykazovali negatívny výsledok.

Obrázok 3 Amplifikácia fragmentu DNA počas PCR reakcie (www.accn.net)



1.16 Označovanie alergénov v potravinách

Označovanie potravín je významným prvkom bezpečnosti potravín z pohľadu ochrany zdravia spotrebiteľa.

Legislatívne danú oblasť upravuje v Slovenskej republike zákon NR SR č. 152/1995 Z.z. o potravinách v znení neskorších predpisov a vykonávací predpis Ministerstva pôdohospodárstva SR (MP SR) a Ministerstva zdravotníctva SR (MZ SR) podľa § 3 tohto zákona – Potravinový kódex SR. Samotné označovanie potravín upravuje Výnos Ministerstva pôdohospodárstva SR a Ministerstva zdravotníctva SR z 28. apríla 2004 č. 1187/2004 – 100, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu Slovenskej republiky upravujúca označovanie potravín, aktualizovaná Výnosom MP SR a MZ SR č. 1761/2005 – 100 zo 14. februára 2005, ďalej Výnosom MP SR a MZ SR č. 3069/2005 – 100 z 18. augusta 2005, Výnosom MP SR a MZ SR č. 3493/2005 – 100 z 26. októbra 2005 a Výnosom MP SR a MZ SR č. 2319/2007-100 zo 7. januára 2008. Potravinový kódex SR je plne harmonizovaný so smernicami Európskej únie v oblasti označovania potravín.

V Európskej únii je oblasť označovania potravín upravená smernicami, čo umožňuje členskému štátu prijať vlastné pravidlá na dosiahnutie cieľa smernice. Takto vznikajúce národné legislatívy spôsobovali nielen prekážky vo voľnom obchode s potravinami, ale predovšetkým zabezpečovali rôznu ochranu zdravia európskeho spotrebiteľa.

Nariadenie (ES) č. 178/2002 Európskeho Parlamentu a Rady z 28. januára 2002, ktorým sa ustanovujú všeobecné zásady a požiadavky potravinového práva, zriaďuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín a stanovujú postupy v záležitostiach bezpečnosti potravín, a ktoré bolo prijaté EÚ ako najvyšší štandard ochrany bezpečnosti potravín, pri požiadavkách na bezpečnosť potravín v článku 14 uvádza, že pri stanovovaní toho, či je niektorá potravinová nebezpečná, sa bude brať ohľad na informácie poskytované spotrebiteľovi, vrátane informácií na etikete alebo iné informácie všeobecne dostupné spotrebiteľovi, týkajúce sa vyhýbania sa konkrétnym nepriaznivým zdravotným účinkom určitej potravinovej kategórie potravín. Zároveň, pri určovaní, či niektorá potravinová je škodlivá pre zdravie, bude sa brať ohľad:

- a) nielen na pravdepodobné bezprostredné a/alebo krátkodobé a/alebo dlhodobé účinky tejto potraviny na zdravie osôb, ktoré ju konzumujú, ale aj na nasledujúce generácie;
- b) na pravdepodobné kumulatívne toxické účinky;
- c) na mimoriadnu citlivosť v súvislosti so zdravím konkrétnej kategórie spotrebiteľov, ak je potravina určená pre túto kategóriu.

Smernica 2000/13/ES Európskeho Parlamentu a Rady z 20. marca 2000 o aproximácii právnych predpisov členských štátov, týkajúcich sa označovania, prezentácie a reklamy potravín (Úradný vestník Európskych Spoločenstiev, č. L 109/29) 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 20 rokmi, v snahe skrátiť príliš dlhé zoznamy zložiek na výrobkoch. V mnohých potravinách sa však vyskytujú alergény ako minoritné zložky, tzv. „skryté alergény“, ktoré priamo ohrozujú zdravie konzumenta trpiaceho potravinovou alergiou (**Babička et al., 2004**).

Táto smernica sa týka tiež potravín, ktoré sa dodávajú do reštaurácií, nemocníc, závodných jedální a iných podobných hromadných stravovacích zariadení. Takisto zahŕňa predbalené potraviny, ktoré predstavujú akúkoľvek jednotlivú položku určenú na prezentáciu ako takú pre konečného spotrebiteľa a pre hromadné stravovacie zariadenia, ktorá pozostáva z potraviny a obalu, do ktorého bola vložená predtým, ako bola ponúknutá na predaj, obalujúci potravinu úplne alebo čiastočne, ale v každom prípade takým spôsobom, že obsah nemôže byť zamenený bez otvorenia alebo výmeny obalu.

Podľa článku 3 tejto smernice k povinným údajom patria:

- (1) názov, pod ktorým sa výrobok predáva;
- (2) zoznam zložiek;
- (3) množstvo určitých zložiek alebo kategórií zložiek, podľa stanovených pravidiel v smernici;
- (4) v prípade predbalených potravín ich netto množstvo;
- (5) doba minimálnej trvanlivosti, alebo v prípade potravín, ktoré z mikrobiologického hľadiska rýchlo podliehajú skaze, dátum „spotrebujte do“;
- (6) všetky osobitné podmienky skladovania alebo podmienky pre použitie;
- (7) meno a obchodné meno a adresa výrobcu alebo baliarne alebo predávajúceho, ktorý je etablovaný v rámci spoločenstva.

Smernica 2000/13/ES Európskeho Parlamentu a Rady neriešila povinné označovanie alergénov, podľa smernice v zozname zložiek sa uvedú všetky zložky potraviny v zostupnom poradí na základe hmotnosti, ako je zaznamenané v čase ich použitia pri výrobe potraviny. Zoznam sa uvedie za vhodným nadpisom, ktorý obsahuje slovo „zložky“. Avšak takýto zoznam nie je povinný, ak zložená zložka tvorí menej ako 25 % konečného výrobku.

Smernica Európskeho Parlamentu a Rady 2003/89/ES, ktorou sa mení a dopĺňa smernica 2000/13/ES o označovaní zložiek prítomných v potravinách s účinnosťou od 25. novembra 2003 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, bude vyznačená na etikete s jednoznačným odkazom na názov tejto zložky. Táto novela bola prijatá so zreteľom na skutočnosti, že určité zložky alebo iné látky používané pri výrobe potravín a prítomné v potravinách spôsobujú u spotrebiteľov alergie alebo prejavy neznášanlivosti, pričom niektoré z týchto alergií alebo prejavov neznášanlivosti predstavujú ohrozenie zdravia dotknutých osôb. Vedecký výbor pre potraviny vytvoril zoznam bežných potravinových alergénov a vyhlásil, že výskyt potravinových alergií je taký, že ovplyvňuje životy mnohých ľudí a vyvoláva stavy pohybujúce sa od veľmi miernych až po potenciálne smrteľné. Zároveň smernica stanovila povinnosť označovať na etikete alergénne zložky uvedené v prílohe III.a tejto smernice, pričom medzi ne patria:

1. obilniny obsahujúce lepok (t.j. pšenica, raž, jačmeň, ovos, špalda, kamut alebo iné hybridné odrody) a výrobky z nich.
2. kôrovce a výrobky z nich.
3. vajcia a výrobky z nich.
4. ryby a výrobky z nich.
5. arašidy a výrobky z nich.
6. sójové bôby a výrobky z nich.
7. mlieko a výrobky z neho (vrátane laktózy).

8. orechy, t.j. mandle (*Amygdalus communis L.*), lieskové orechy (*Corylus avellana*), vlašské orechy (*Juglans regia*), kešu (*Anacardium occidentale*), pekanové orechy (*Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch*), para orechy (*Bertholletia excelsa*), pistácie (*Pistacia vera*), makadamové orechy a queenslandské orechy (*Macadamia ternifolia*) a výrobky z nich.
9. zeler a výrobky z neho.
10. horčica a výrobky z nej.
11. sezamové semená a výrobky z nich.
12. oxid siričitý a siričitany v koncentráciách vyšších ako 10 mg/kg alebo 10 mg/liter „vyjadrené ako SO₂.“
13. vlčí bôb a výrobky z neho.
14. mäkkýše a výrobky z nich.

Smernica 2003/89/ES zakázala od 25. novembra 2005 predaj výrobkov, ktoré neboli v súlade s podmienkami označovania v nej uvedené. Zároveň Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA) kontinuálne prehodnocoval na báze vedeckého hodnotenia rizika alergické vlastnosti potravinových zložiek za účelom revízie zoznamu v záujme ochrany zdravia spotrebiteľa.

Prílohou III.a k smernici 2000/13/ES sa ustanovuje zoznam zložiek potravín, ktoré je potrebné uviesť na označení, keďže je možné, že u citlivých jedincov vyvolávajú negatívne reakcie. Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA) na základe vedeckého hodnotenia rizika a údajov od výrobcov posúdil alergénnosť určitých potravinárskych výrobkov s tým, že určité výrobky vyrobené z týchto zložiek nemôžu alebo je veľmi pravdepodobné, že nemôžu u jednotlivých jedincov vyvolať negatívne reakcie, pričom z prílohy III.a k smernici 2000/13/ES bolo novelizáciou tohto predpisu cez smernicu Komisie 2005/26/ES od 25. novembra 2005 do 25. novembra 2007 dočasne vylúčené povinné označovanie niektorých alergénnych zložiek a potravinárskych výrobkov ako napríklad: jačmenný glukózový sirup (glutén), obilniny použité v destilátoch pri výrobe liehovín (glutén), vaječný albumín použitý ako prostriedok na čírenie vína a muštu, rybacia želatína použitá ako nosič vitamínov alebo karotenoidových prípravkov, úplne rafinovaný sójový olej a tuk, fytosteroly a estery fytosterolov získané z rastlinných olejov sójového pôvodu, laktitol, srvátka použitá v destilátoch pri výrobe liehovín, orechy použité v destilátoch pri výrobe liehovín a arómy z orechov použité pri výrobe liehovín (mandle,

vlašské orechy), olej z listu a semien zeleru, oleorezín zo zelerového semena, horčicový olej, oleorezín z horčicového semena.

V súčasnosti sa pripravuje nová legislatíva Európskej únie pre označovanie potravín všeobecne, vrátane označovania alergénov v potravinách, vo forme nariadenia (nariadenie je priamo aplikovateľné a záväzné vo všetkých členských štátoch, doteraz bola legislatíva vo forme smernice), ktorá by mala byť významným prínosom pre ochranu zdravia spotrebiteľa. Podľa návrhu nariadenia Európskeho Parlamentu a Rady o poskytovaní informácií o potravinách spotrebiteľom (predložené Komisiou), Brusel, 30. januára 2008, KOM (2008) 40 v konečnom znení, 2008/0028 (COD), príloha II definuje nasledujúce zložky spôsobujúce alergie alebo neznášanlivosť.

PRÍLOHA II: Zložky spôsobujúce alergie alebo neznášanlivosť

1. obilniny obsahujúce glutén (hlavne pšenica obyčajná, raž, jačmeň, ovos, špalda, cirok alebo ich hybridné odrody) a výrobky z nich okrem:

- a) glukózových sirupov na báze pšenice vrátane dextrózy;
- b) maltodextrínov na báze pšenice;
- c) glukózových sirupov na ražnej báze;
- d) obilnín použitých pri výrobe destilátov alebo etylalkoholu poľnohospodárskeho pôvodu pre alkoholické a iné nápoje obsahujúce viac ako 1,2 objemového percenta alkoholu.

2. kôrovce a výrobky z kôrovcov.

3. vajcia a výrobky z vajec.

4. ryby a výrobky z rýb okrem:

- a) rybacej želatíny používanej ako nosič vitamínov alebo karoténových prípravkov;
- b) rybacej želatíny alebo želatíny používanej ako číriace činidlo v pive a víne.

5. arašidy a výrobky z arašidov.

6. sójové bôby a výrobky zo sójových bôbov okrem:

- a) plne rafinovaného sójového oleja a tuku;
- b) zmesí prírodných tokoferolov (E306), prírodného D-alfa tokoferolu, prírodného acetátu D-alfa-tokoferolu, prírodného D-alfa-tokoferolsukcinátu sójového pôvodu;
- c) rastlinné oleje vyrobené z fytosterolov a fytosterolových esterov zo sójových

bôbov;

d) rastlinný stanolester vyrobený z rastlinných olejových sterolov zo sójových bôbov.

7. mlieko a mliečne výrobky (vrátane laktózy) okrem:

a) srvátky použitej na výrobu destilátov alebo etylalkoholu poľnohospodárskeho pôvodu pre alkoholické a iné nápoje obsahujúce viac ako 1,2 objemového percenta alkoholu;

b) laktitolu.

8. orechy, hlavne mandle (*Amygdalus communis L.*), lieskové oriešky (*Corylus avellana*), vlašské orechy (*Juglans regia*), kešu oriešky (*Anacardium occidentale*), pekanové orechy (*Carya illinoensis (Wangenh.) K. Koch*), brazílske orechy (*Bertholletia excelsa*), pistáciové oriešky (*Pistacia vera*), makadamské orechy a queenslandské orechy (*Macadamia ternifolia*) a výrobky z nich okrem:

a) orechov používaných na výrobu destilátov alebo etylalkoholu prírodného pôvodu pre alkoholické a iné nápoje obsahujúce viac ako 1,2 objemového percenta alkoholu.

9. zeler a výrobky zo zeleru.

10. horčica a výrobky z horčice.

11. sezamové semiačka a výrobky zo sezamových semiačok.

12. kysličník siričitý a sírany v koncentráciách vyšších ako 10 mg/kg alebo 10 mg/l vyjadrené ako SO₂.

13. vlčí bôb a výrobky z vlčieho bôbu.

14. mäkkýše a výrobky z mäkkýšov.

Pracovný dokument útvarov Európskej komisie k návrhu Nariadenia Európskeho Parlamentu a Rady o poskytovaní informácií o potravinách spotrebiteľom, Brusel, SEK (2008) 95 pod názvom Súhrnná správa o hodnotení vplyvu, pokiaľ ide o otázky všeobecného označovania potravín (www.europa.eu), v preambule uvádza, že všeobecné označovanie potravín sa riadi smernicou 2000/13/ES, ktorá je kodifikovanou verziou smernice 79/112/ES. Hoci jedna veľká zmena a doplnenie bola uvedená nedávno, v roku 2003 (alergické zložky), väčšina ustanovení pochádza z roku 1978. Vývoj potravinového trhu, ako aj očakávaní zákazníkov vyjadruje nevyhnutnosť aktualizácie a modernizácie týchto právnych predpisov. Podľa tohto dokumentu, hlavné ciele právnych predpisov o označovaní potravín sú:

- umožniť spotrebiteľom uskutočňovať informovaný, bezpečný, zdravý a udržateľný výber;
- poskytovať spotrebiteľom relevantné, užitočné a legitímne očakávané informácie;
- zabezpečiť hladké fungovanie vnútorného trhu;
- podporovať súťažné trhové prostredie.

So zreteľom na tento cieľ by mal široký rozsah revízie odrážať tieto osobitné ciele:

- zabezpečiť dôslednosť a jasnosť v poskytovaní informácií;
- chrániť zdravie spotrebiteľov a zaoberať sa osobitnými požiadavkami spotrebiteľov na informácie;
- vyhýbať sa klamlivým označeniam a eliminovať existujúce nezrovnalosti;
- umožňovať a odmeňovať inováciu odvetvia a povoliť mu plne využívať právomoc označovania pri predaji svojich výrobkov.

Pretože označovanie by malo byť komplexné a súčasné je nejasné, čo spôsobuje problémy v aplikácii legislatívy a pri kontrole, Európska komisia urobila krok spolu so zástupcami členských štátov, spotrebiteľmi, priemyslom, iniciovať a zhodnotiť legislatívu na označovanie a zmodernizovať ju (www.ec.europa.eu).

Podľa súhrnnej správy komisie, radikálnou novinkou je vytvorenie pružného mechanizmu smerom zdola nahor (nového režimu označovania), ktorý odvetviu umožní inovovať a prispôbovať pravidlá označovania rôznym a neustále sa meniacim trhom a dopytu spotrebiteľov; ďalej prepracovanie rôznych horizontálnych ustanovení o označovaní. Zlúčením týchto textov sa maximálne zvýšia synergie, na minimum zníži počet prekrývajúcich sa a nadbytočných ustanovení a zvýši sa jasnosť a dôslednosť pravidiel Spoločenstva, zabezpečí sa racionalizácia (aktualizácia, vyjasnenie, odstránenie nadbytočností) povinných informácií vyžadovaných článkom 3 ods. 1 smernice 2000/13/ES. Nová legislatíva by mala podľa prieskumu predovšetkým riešiť otázky čitateľnosti etikiet, nedostatok informácií o alergických zložkách na nepredbalených potravinách – cieľom je chrániť zdravie spotrebiteľov a zabezpečiť dôslednosť v poskytovaní informácií, riešiť otázky označenia pôvodu a označovania zložiek alkoholických nápojov.

Podľa súhrnnej správy komisie, spotrebiteľom trpiacim na alergie alebo neznášanlivosť na určité zložky potravín dobre slúžia súčasné právne predpisy, pokiaľ ide o poskytovanie informácií na predbalených potravinách. Tieto potraviny však tvoria len časť stravy týchto spotrebiteľov a dopyt rozšíriť požiadavky na predbalené potraviny aj na nepredbalené potraviny sa stále zvyšuje. Predovšetkým preto, že poskytnutie alebo zahrnutie nesprávnej informácie má potenciálne zdravotné dôsledky. Analýza ukazuje, že poskytovanie informácií o prítomnosti alergénov reaguje na obavu o bezpečnosť a zdravie, ktorú vyjadrili spotrebiteľia. Hoci z hľadiska dotknutého odvetvia sú celkové náklady zrejme významné, prevádzkové náklady sa ťažko kvantifikujú. Zdá sa, že problémom nie je vlastná výroba fyzickej etikety na potraviny predávané voľne, ale problémy môžu vzniknúť so získavaním a aktualizovaním informácií. Informačné náklady sa znížia, keď sa zabezpečí, aby boli požadované informácie maloobchodným predajcom predávajúcim nepredbalené potraviny a reštauráciám ľahko k dispozícii od ich dodávateľov.

Inštitút UCB je globálna biofarmaceutická spoločnosť špecializovaná na dve terapeutické oblasti: ochorenia centrálného nervového systému a imunológiu. V súčasnosti Inštitút UCB pôsobí vo viac ako 40 štátoch Európy a sveta, sídlo UCB Inštitútu je v Belgicku, Bruseli, vedecký tím je podporovaný viac ako 10 000 zamestnancami. Od roku 1965 spolupracuje s významnými farmaceutickými a biotechnologickými firmami pri výskume liečiv, napr. aj antibiotík a antihistaminík (www.ucb.com). Inštitút UCB pôsobí na Slovensku i v Českej republike ako nezávislá a nezisková organizácia, ktorá má za cieľ bojovať proti narastajúcemu počtu alergických ochorení (www.alergie.cz). Hlavné aktivity inštitútu sú príprava a distribúcia informácií o alergických ochoreniach lekárom i laickej verejnosti, podpora komunikácie medzi lekármi a klinickým výskumom, informácie a motivácie príslušných štátnych a verejných orgánov pre prijímanie preventívnych opatrení. V spolupráci s Európskym Parlamentom vypracoval UCB inštitút rozsiahly dokument "Európska biela kniha alergie" (www.alergie.cz), ktorá obsahuje údaje o výskyte, liečbe a organizácii starostlivosti o alergikov v krajinách Európskej únie.

Európska biela kniha alergie uvádza, že početné štúdie poukazujú na dramatický vzostup alergických ochorení v posledných dekádach. Rovnako epidemiologické vyšetrenia dokazujú rýchly nárast alergických ochorení. Dôležitú úlohu tu zohrávajú

najrôznejšie faktory vrátane komplexnej interakcie so životným prostredím, napr. kvalita bývania, spôsob stravovania, životné prostredie, meniace sa v závislosti od rozvoja priemyslu a chemického spracovania surovín. Epidemiologický výskum, zameraný na príčiny týchto zmien, má pre cieľavedomý a hospodárny prístup k preventívnym alebo liečebným opatreniam zásadný význam. V každom prípade súčasné odhady priamych a nepriamych nákladov na problémy spojené s alergiami v Európe sa pohybujú okolo 29 miliárd ECU ročne.

Hlavným cieľom nie je však len liečba týchto ochorení, ale najmä ich prevencia. Preventívne opatrenia sa rozdeľujú do troch úrovní. Do tzv. primárnej úrovne prevencie patria preventívne opatrenia určené rizikovým deťom bez symptómov ochorenia. Sekundárna prevencia je zameraná na deti, ktoré už majú niektoré základné znaky atopického ochorenia (hoci len laboratórne). Terciálnou prevenciou je prevencia ďalšieho postupu ochorenia u pacientov s dlhotrvajúcimi prejavmi choroby.

Pre porovnanie legislatívy, U.S. FDA (Food and Drug Administration) v USA informuje, že potravinové právo pre označovanie alergénov a ochranu spotrebiteľa Spojených štátov amerických (USA) pod názvom FALCPA, ktoré vstúpilo do platnosti 1. januára 2006 uvádza, že označovanie je požadované, ak potravinu obsahuje významnejší potravinový alergén. Tento je definovaný ako jedna z nasledujúcich potravín alebo skupín potravín, alebo jeho zložka obsahuje proteín odvodený z týchto potravín alebo skupín:

1. mlieko;
2. vajcia;
3. arašidy;
4. orechy ako mandle, vlašské orechy a pekany;
5. sójové bôby;
6. pšenica;
7. ryby;
8. kôrovce.

Tieto potraviny alebo skupiny potravín zodpovedajú za 90 percent potravinových alergií v USA a FALCPA sa zameriava na IgE – súvisiace alergie. Táto legislatíva nechráni každého, kto má alergiu, ale chráni väčšinu ľudí, ktorí môžu mať rôzne alergické reakcie na potraviny. Viac ako 160 rôznych potravín bolo zistených v USA, ktoré

spôsobujú alergie, zoznam hlavných alergénov v spojených štátoch je limitovaný na osem potravín. Ostatné krajiny môžu mať rozdielne potraviny na svojich zoznamoch, pretože potravinové alergie odrážajú stravovacie modely. Napríklad v Európe je vysoká prevencia alergií na horčicu a zeler (www.fda.gov).

Codex Alimentarius FAO/WHO vo všeobecnom štandarde pre označovanie potravín (Codex STAN 1-1985) upravuje označovanie potravín a ich zložiek, ktoré spôsobujú hypersenzitivitu a musia byť vždy na obale deklarované, kategorizuje osem skupín alergénov (obilniny obsahujúce glutén; kôrovce a výrobky z nich; vajcia a vaječné výrobky; ryby a výrobky z nich; arašidy, sóju a výrobky z nich; mlieko a mliečne výrobky; orechy a výrobky z nich a oxid siričitý v koncentrácii 10 mg/kg^{-1} alebo viac. FAO/WHO a komisia Codex Alimentarius nezaraďuje zeler do skupiny potravinových alergénov.

1.17 Prevencia a liečba alergických ochorení

Primárna prevencia potravinovej alergie podľa **Chovancovej (1999)** spočíva v nasledovných bodoch:

- začína už počas tehotenstva, najmä u alergických matiek. Od 12. týždňa tehotenstva sa odporúča eliminačná diéta.
- sú jednoznačné dôkazy o vyššom výskyte alergie u matiek vystavených dymu z cigariet.
- od polovice gravidity sa odporúča vynechávať ryby a orechy, obmedziť príjem vajec a kravského mlieka.
- diétne opatrenia treba dodržiavať aj počas obdobia dojčenia, pričom toto obdobie by malo byť aspoň 6 mesiacov. Odporúča sa zavádzanie nových potravinových zložiek najskôr po 6 mesiaci veku dieťaťa.
- do konca prvého roku nepodávame dojčaťu vajíčka, ryby, orechy.
- nové druhy potravy v druhom polroku sa do jedálneho lístka dieťaťa majú zavádzať postupne a opatrne, vždy v trojtýždňových intervaloch.
- tri týždne po vírusovej infekcii nezavádzame v druhom polroku života dieťaťa nové druhy potravín.

Vo vzťahu k prevencii pred potravinovými alergiami, prvoradý význam má prevencia potravinovej (a následne ostatnej) alergie výživou v prvom roku života. Výlučným dojčením v priebehu prvých 6 mesiacov života sa oddiali kontakt s cudzorodou

bielkovinou, čo má pre ďalší vývoj geneticky predisponovaného atopika zásadný význam. Dojčenie v prvých mesiacoch života nezabezpečuje iba optimálnu výživu, ale prospieva aj ku skorému vyzrievaniu čreva (čo bráni prieniku makromolekúl) a k optimálnemu osídleniu sliznice dieťa potrebou mikroflóry. Ukázalo sa, že laktobacilová, bifidogénna a iná probiotická mikroflóra má kľúčovú úlohu pri vzniku optimálnej odpovede na environmentálne antigény. Popri dojčení má preto zásadný význam aj vyhnutie sa antibiotickej liečbe, ktorá ušľachtilú mikroflóru ničí. Na druhej strane sa opakovane potvrdilo, že fajčenie matky v gravidite riziko vzniku alergie významne zvyšuje, preto nefajčenie treba považovať za prevenciu zásadného významu (**Hrubíško et al., 2003**).

Gamlinová (2003) uvádza, že viaceré štúdie potvrdili súvislosť medzi užívaním antibiotík v prvých dvoch rokoch života a neskorým vznikom alergií či astmy. Najrozsiahlejší výskum uskutočnili lekári v Oxforde vo Veľkej Británii, ktorí sledovali 1900 detí až do veku šesťnásť rokov. U detí s rizikom vzniku alergie (keďže ich matky trpeli na alergiu), užívajúcimi antibiotiká pred dovŕšením dvoch rokov veku, sa zvýšil výskyt alergií z 32 % na 54 %. Riziko bolo tým väčšie, čím viac antibiotických kultúr deti absorbovali.

Základným opatrením smerujúcim k predchádzaniu alergií na kravské mlieko je čo najdlhšie kojenie, obzvlášť detí, u ktorých sa už v rodine vyskytla potravinová alerggia (**Rujner, Cichanska, 2006**).

Jedinci citliví na potravinové alergény musia vylúčiť príslušné alergény zo stravy. Preto potraviny, o ktorých sa predpokladá, že alergény neobsahujú, ich skutočne obsahovať nesmú. U technologicky upravovaných potravín je preto nutné vylúčiť, aby sa alergény dostali do potravín prostredníctvom prísad, alebo krížovou kontamináciou (**Chovancová, 1999**).

Gamlinová (2003) uvádza pri potravinovej alergii dve formy diét. Diétu s vylúčením známej potraviny môžu využiť jedinci, u ktorých sa potvrdilo, na akú potravinu či potraviny sú alergickí. Diagnostická diéta je vhodná v prípade, keď príznaky naznačujú, že by pacient mohol trpieť určitou precitlivosťou na potraviny. Diagnostické diéty sa ďalej delia na dve základné kategórie:

- eliminačné diéty, pri ktorých sa vylučovacou metódou určí potravina (alebo potraviny) spôsobujúca príznaky. Pri takejto diéte sa najprv prestanú konzumovať všetky bežne požívané potraviny a potom sa každá potravina overuje samostatne.

Po skončení eliminačnej diéty sa získané informácie použijú na zostavenie vhodnej diéty s vylúčením škodlivej potraviny či potravín.

- špecifické diagnostické diéty – znižujúce príjem určitej látky obsiahnutej v niektorých potravinách. Ide o látky (napríklad histamín alebo nikel), o ktorých je známe, že môžu vyvolávať príznaky u precitlivených ľudí. Pri špecifickej diagnostickej diéte sa vyradia všetky potraviny s vysokým obsahom podozrivej látky. Ak diéta natrvalo zmierni príznaky, je veľmi pravdepodobné, že na vine je skutočne daná látka.

Treba zdôrazniť, že potenciálne fatálne alergické reakcie zvyčajne vznikajú krátko po zjedení potravy (rádovo minúty), a preto jedinou liečbou prvej voľby, ktorú treba podať ihneď pri prvých prejavoch, je adrenalín (1:1 000; 0,01 ml/kg, celkovo do 0,3 – 0,5 ml), podľa stavu aj opakovane. Parentálne podaný adrenalín je vo všetkých prípadoch anafylaxie farmakom číslo jeden. Účinkom na vazomotorický tonus upravuje cirkulačný kolaps a bráni ďalšiemu uvoľňovaniu chemických mediátorov. Úmrtia na anafylaxiu, keď nechýbala prítomnosť prvej pomoci, boli väčšinou výsledkom oneskoreného podania adrenalínu a závažných respiračných komplikácií. V retrospektívnom prehľade 6 fatálnych a 7 nefatálnych anafylaktických reakcií vyvolaných potravinami u detí a dospelých sa zistilo, že všetci, ktorí prežili, dostali adrenalín do 5 minút po zjavení sa závažných respiračných príznakov (**Sampson et al., 1992**).

2 Cieľ práce

Cieľom dizertačnej práce bolo:

- 1) identifikovať detekčný limit zeleru pomocou klasickej PCR metódy (end-point);
- 2) zistiť obsah zeleru v koreniách pomocou klasickej PCR metódy;
- 3) identifikovať detekčný limit zeleru pomocou real-time PCR s využitím EvaGreen[®] Real-Time PCR a SYBRGreen[®] Real-Time PCR;
- 4) zistiť obsah zeleru v koreniách pomocou real-time PCR s využitím EvaGreen[®] Real-Time PCR a SYBRGreen[®] Real-Time PCR;
- 5) overiť alergenicitu vzoriek na prítomnosť a obsah zeleru vo vzorkách korení najmä z tretích krajín;
- 6) navrhnúť využitie metódy pre potravinársku prax.

Dizertačná práca rozšíri poznatky laboratórnej diagnostiky v oblasti detekcie alergénu – zeleru v potravinách. Overí sa spoľahlivosť použitia metódy real-time PCR na detekciu zeleru v potravinách a jemu príbuzných druhov v rámci čeľade *Apiaceae*, zároveň sa overí jej využitie na stanovenie prítomnosti a obsahu (kvantifikácia) zeleru vo vzorkách potravín z domácej produkcie, EÚ a tretích krajín. Získané výsledky overia uplatňovanie potravinového práva EÚ v záujme ochrany zdravia európskeho spotrebiteľa.

Výsledkami prispejeme k optimalizácii analytických metód stanovenia zeleru ako alergénu v potravinách. Zároveň overíme vhodnosť použitej metódy aj na zeleru príbuzné druhy z čeľade *Apiaceae*, ktoré alergológia považuje sa alergény v potravinách, napriek tomu, že potravinové právo ich zatiaľ nešpecifikuje. Presnosť a správnosť laboratórných výsledkov má význam z pohľadu laboratórnej diagnostiky a bezpečnosti potravín.

Vhodnosť metódy má prínos i pre oblasť správnej výrobnéj praxe v potravinárskych prevádzkach, ktoré spracúvajú, resp. distribuujú a skladujú koreniace zmesi a prípravky, ako i ďalšie výrobky obsahujúce zeler a jemu príbuzné druhy z čeľade *Apiaceae*, v záujme zabránenia krížovej kontaminácie a garancii bezpečnosti produktov. Vyhodnotenie výsledkov meraní vo vzorkách potravín z tretích krajín, kde označovanie zeleru ako alergénu nie je povinné, prinesie informácie o správnosti aplikácie potravinového práva EÚ zo strany prevádzkovateľov potravinárskych podnikov v tretích krajinách.

3 Materiál a metodika

3.1 Analyzovaný materiál

Vzorky zelerovej hl'uzy (*Apium graveolens*) boli zakúpené v obchodnej sieti.

Vzorky korenín a koreninových zmesí pochádzajú z domácej produkcie, krajín EÚ a tretích krajín, pričom boli zakúpené v obchodnej sieti alebo cez Internetový predaj. Celkovo bolo analyzovaných 15 vzoriek, pričom optimalizácia laboratórnych procesov sa zabezpečila celkom piatimi opakovaniami.

Z domácej produkcie pochádzali:

- vzorka 1 Fenikel celý;
- vzorka 2 Kôpor sušený;
- vzorka 3 Aníz;
- vzorka 4 Koriander mletý;
- vzorka 5 Rasca celá;
- vzorka 6 Karí - zmes korenia.

Vzorky boli zakúpené v obchodnej sieti.

Z dovozu z tretích krajín mimo Európskej únie pochádzali vzorky:



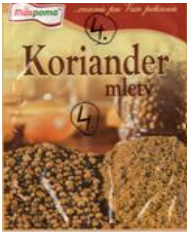

- vzorka 7 Pasta na sečuánsku ostrokyslú polievku;
- vzorka 8 Tandoori Tikka marináda;
- vzorka 9 Červená Curry pasta na spôsob country;
- vzorka 10 Červená Curry pasta;
- vzorka 11 Koreninová zmes na opečenú orientálnu ryžu;
- vzorka 12 Sladko – kyslá koreniaca zmes;
- vzorka 13 Čínska zmes piatich korení (Pae-Lo korenie);
- vzorka 14 Koreninová zmes na pečené kura;



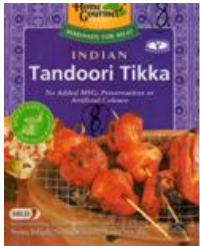


Z krajiny Eúropskej únie (UK) pochádzala vzorka:


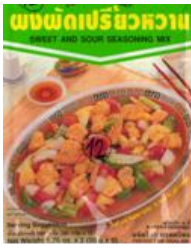

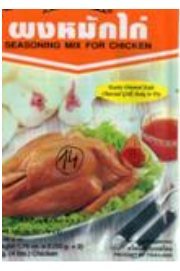

- vzorka 15 TANDOORI MASALA – grilovacie korenie.

Tieto vzorky boli zakúpené cez Internetový predaj.

Tabuľka 4 Charakterizácia analyzovaných vzoriek

Poradové číslo vzorky	Názov	Zloženie/označenie	Krajina pôvodu	Obal vzorky
Vzorka 1	Fenikel celý	Zloženie: fenikel celý.	SR	
Vzorka 2	Kôpor sušený	Zloženie: kôpor sušený.	SR	
Vzorka 3	Aníz	Zloženie: aníz.	SR	
Vzorka 4	Koriander mletý	Zloženie: koriander mletý.	SR	
Vzorka 5	Rasca celá	Zloženie: rasca celá. Označenie: „Výrobok môže obsahovať stopové množstvá zeleru, horčice, sezamového semienka a gluténu“.	SR	

Por. číslo vzorky	Názov	Zloženie/označenie	Krajina pôvodu	Obal vzorky
Vzorka 6	Karí – zmes korenia	Zloženie: kurkuma, koriander mletý, rasca mletá, fenikel mletý, čierne korenie mleté, klinček mletý, chilli mleté. Označenie: „Výrobok môže obsahovať stopové množstvá zeleru, horčice, sezamového semena a gluténu“.	SR	
Vzorka 7	Pasta na sečuánsku ostrokyslú polievku	Zloženie: sójová omáčka, cukor, kúsky čili, soľ, cibuľa, čili korenie, sušené hříby, ocot, modifikovaný škrob, farbivo E150a (karamel).	Thajsko	
Vzorka 8	Tandoori Tikka marináda	Zloženie: cesnak, sójový olej, soľ, korenie, koriander, karí, čili, zázvor, kardamón, biele korenie, sušené bylinky.	Thajsko	
Vzorka 9	Červená Curry pasta na spôsob country	Zloženie: sójové bôby, čili, šalotka, cesnak, citrónová tráva.	Thajsko	
Vzorka 10	Červená Curry pasta	Zloženie: čili, citrónová tráva, cesnak, soľ, Galangal korenie, šalotka, krevetová pasta, limetková kôra, kuminový prášok. Označenie nedeklarované v slovenskom jazyku.	Thajsko	

Por. číslo vzorky	Názov	Zloženie/označenie	Krajina pôvodu	Obal vzorky
Vzorka 11	Koreninová zmes na opečenú orientálnu ryžu	Zloženie: dextróza, soľ, octový prášok, sójový prášok, korenie, emulgátor E 551.	Thajsko	
Vzorka 12	Sladko – kyslá koreniaca zmes	Zloženie: cukor, kukuričný škrob, octový prášok, rajčínový prášok, sójový prášok, aróma E 621, regulátor kyslosti E 330, koreniny (biele korenie, škorica, čili, petržlen, klinček), soľ, protihrudkujúca látka E 341. Označenie výrobku v slovenskom jazyku neuvedené.	Thajsko	
Vzorka 13	Čínska zmes piatich korení (Pae – Lo korenie)	Zloženie: škorica, koriander, bobkový list, aníz, nové korenie.	Thajsko	
Vzorka 14	Koreninová zmes na pečené kura	Zloženie: cukor, sójový prášok, soľ, cesnak, korenie, sójový olej, emulgátor E 551. Korenie v anglickom jazyku rozpísané na zložky: senovka grécka, paprika, horčica, koriander.	Čína	
Vzorka 15	TANDOORI MASALA – grilovacie korenie	Zloženie: koriander, soľ, senovka grécka, kumín, škorica, čili, čierne korenie, zázvor, cibuľa, cesnak, horčica, farbivo E 124 a E 102, kyselina citrónová, kardamón. V anglickom jazyku navyše v zložení uvedené: vavrínové listy, muškátový orech, klinčeky, muškátový kvet, kardamón.	UK	

Protikontaminačné opatrenia: Vzhľadom na vysokú citlivosť PCR je veľmi dôležitou stránkou jej praktického použitia vykonávanie protikontaminačných opatrení. K nim patrí používanie jednorazového plastového materiálu kategórie čistoty „DNA – free“ vrátane špičiek k mechanickým pipetám s protiaerosolovým filtrom, práca so zásobnými roztokmi a vodou rozdelenými a skladovanými v malých dávkach, príprava vzoriek a reakčných zmesí v oddelených priestoroch, ktoré sú dôkladne dekontaminované použitím UV-C-svetla a roztoku chlórnanu, a podobne pravidelná dekontaminácia laboratórných pomôcok. Závažným zdrojom kontaminácie môže byť otváranie skúmaviek po PCR a ich pipetovanie do gélu pri elektroforetickej analýze. Pri práci s chemikáliami boli dodržiavané bezpečnostné opatrenia uvedené v príslušných užívateľských manuáloch.

3.2 Experimentálny materiál a organizácia experimentov

Odber a spracovanie vzoriek

Príprava vzorky zo zakúpenej hľuzy zeleru spočívala v umytí hľuzy, ošúpaní, nastrúhaní jadra hľuzy a následným sušením pri teplote 60 °C 12 hodín. Po vysušení sme jednotlivé kúsky rozomleli mixérom na jemný prášok a zhomogenizovali 10 minút pri 10 000 otáčkach za minútu v homogenizátore (Ovidomix). Na prípravu rôznych koncentrácií sme použili hladkú múku. Zelerový prášok s múkou sme miešali desiatkovým systémom riedenia nasledovne: 0,5 g vzorky zeleru na 4,5 g hladkej múky. Vzorky sme vážili na analytických váhach Sartorius s presnosťou na 3 desatinné miesta. Po navážení sa vzorky dokonale premiešali za pomoci Vortexu (Biosan) približne 1 minútu. Takýmto spôsobom sme pripravili 9 riedení od 100 % kontrolnej vzorky (vzorka čistého zelerového prášku) až po vzorku s obsahom zeleru 0,000001 %. Všetky hodnoty sú uvedené v tabuľke 5.

Tabuľka 5 Navážka vzoriek

Názov vzorky	Obsah zeleru vo vzorke [%]
vzorka 1	100
vzorka 2	10
vzorka 3	1
vzorka 4	0,1
vzorka 5	0,01
vzorka 6	0,001
vzorka 7	0,0001
vzorka 8	0,00001
vzorka 9	0,000001
Neg. kontrola	0

Extrakcia DNA

NucleoSpin[®] Food Kits poskytuje rýchly, účinný a ekonomický prostriedok na purifikáciu nukleových kyselín zo širokého spektra vzoriek potravín rastlinného aj živočíšneho pôvodu. Izolácia genomickej DNA z potravín napomáha pri detegovaní a identifikovaní kontaminácie, geneticky modifikovaných organizmov (GMOs) alebo identifikácii individuálnych rastlinných a živočíšnych druhov. Vzorky potravín sú vysoko heterogénne a môžu obsahovať významné množstvo zložiek ako sú tuky a polysacharidy, ktoré môžu viesť k problémom pri extrakcii alebo neskoršom spracovávaní DNA. NucleoSpin[®] Food Kit protokol slúži na extrakciu DNA z rôznych druhov potravín a zabezpečuje získanie fragmentov genomickej DNA aj z vysoko spracovaných vzoriek potravín. Každá kolóna obsahuje špeciálne aktivovaný kremičitý membránový filter, ktorý zachytáva nukleové kyseliny a oddeľuje ich od kontaminujúcich proteínov, tukov a ostatného bunkového odpadu. Po tom, ako rozpustné kontaminanty sú odstredené prostredníctvom filtra, nukleové kyseliny sú vymývané v pufri. Umožňuje kompletne odstránenie inhibítorov PCR z rôznych matric a získať vysoko kvalitnú DNA.

Extrakciu DNA zo vzoriek sme vykonali za pomoci komerčného kitu určeného na genomickú purifikáciu DNA z potravín NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel, Suisse) podľa priloženého protokolu v nasledovných krokoch.

Navážime 200 mg vzorky, ktorú vsypeme do ependorfky a pridáme k nej 550 µl lyzačného roztoku CF predhriateho na 65 °C a 10 µl Proteinázy K. Vzorku zamiešame a vložíme na inkubáciu do termostatu pri 65 °C po dobu 30 minút. Následne dáme vzorku sцентрифugovať na prístroji Hermle Z 160M (Biotech) pri otáčkach > 10 000 x g po dobu 10 minút. Vzniknutý číry roztok - lyzát - 300 µl, prepipetujeme do nových ependorfiek a pridáme k nemu 300 µl roztoku C4 (Binding Buffer), 300 µl etanolu a zvortexujeme cca. 30 sekúnd. Z ependorfky napipetujeme 750 µl do NucleoSpin® Food Column a centrifugujeme 1 minútu pri otáčkach 11 000 x g. Zvyšný roztok 250 µl v ependorfkách napipetujeme do NucleoSpin® Food Column a znovu centrifugujeme 1 minútu pri otáčkach 11 000 x g. Pri prvom premývaní do NucleoSpin® Food Column napipetujeme 400 µl roztoku CQW (Wash Buffer) a centrifugujeme 1 minútu pri otáčkach 11 000 x g. Pri druhom premývaní do NucleoSpin® Food Column napipetujeme 700 µl roztoku C5 (Wash Buffer) a centrifugujeme 1 minútu pri otáčkach 11 000 x g. Pri treťom premývaní do NucleoSpin® Food Column napipetujeme 200 µl roztoku C5 (Wash Buffer) a centrifugujeme 2 minúty pri otáčkach 11 000 x g. NucleoSpin® Food Column vložíme do nových ependorfiek a napipetujeme do nich 100 µl roztoku CE (Elution Buffer) predhriateho na 70 °C. Vzorky inkubujeme 5 minút pri izbovej teplote a následne centrifugujeme 1 minútu pri otáčkach 11 000 x g.

Odber všetkých vzoriek, ako aj manipulácia s nimi (skladovanie), boli vykonávané za štandardných podmienok teploty prostredia 23 – 25 °C a relatívnej vlhkosti vzduchu 40 – 60 %.

Počas prípravy jednotlivých vzoriek bol veľký dôraz kladený na čistotu blízkeho okolia, ako aj na sterilitu všetkých použitých pomôcok s cieľom vylúčenia novej kontaminácie. Adekvátna pozornosť bola venovaná aj zdravotnému stavu manipulujúcich osôb s cieľom ochrany ich zdravia z dôvodu manipulácie s potravinovými alergénmi a možného vzniku nežiaducich reakcií organizmu.

Prajmery

Na detekciu prítomnosti zeleru vo vzorke sme použili prajmery na detekciu manitol dehydrogenázy (GenBank, Accession No. AF067082). Prajmery sme použili od autorov **(Dovičovičová et al., 2004)**.

Autori navrhli prajmery celF 5'-CAGCCTGTTTCCCGTACGAGAT-3' a

celR 5'-TGCCAAATAAAGATTCGAGATTGT-3'.

Prajmery boli navrhnuté a otestované programom Primer Express software (Applied Biosystem) s teoretickou teplotou topenia okolo 60 °C. Prajmery boli otestované s nehomologickými DNA sekvenciami iných rastlín použitím softvéru Blast 2.1 (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md., USA). Výber správnej sekvencie prajmerov je podmienkou pre úspešný priebeh amplifikačnej reakcie, chybný návrh sekvencie prajmerov vedie k úplne neúčinnnej, alebo nešpecifickej amplifikácii.

Prístrojová technika:

Homogenizátor kompaktný vír.

Model: BioVortex V1 Plus
Výrobca: BIOSAN, Litva
Orbitálna agitácia: 4 mm
Rýchlosť: 250 – 3 000 rpm
Kapacita: rúrky (zúžené), 1,5 – 50 ml
Napätie: 12 V, 500 mA (s externým adaptérom)
Rozmery (šxvxh): 90x150x80 mm
Hmotnosť: 0,54 kg

Centrifúga

Model: Z – 160 M
Výrobca: HERMLE LABORTECHNIK, SRN
Max. rýchlosť: 14 000 ot/min
Max RCF: 15 996 xg
Max. hladina hluku: 57 dBa
Rozmery (šxvxh): 20x18x22 cm
Hmotnosť: 5,5 kg
Spotreba el. energie: 120 W

Elektroforéza - malá horizontálna elektroforéza pre agarózovú separáciu DNA/RNA v agarózovom géli

Model EP – 150

Výrobca: THERMO SCIENTIFIC OWL SEPARATION SYSTEMS LTD., USA

Rozmery gélu/objem pufru/počet vzoriek: 70 x 80 mm/400 ml/5 – 24 vzoriek

Váhy

Model: TE 214 S-OCE 220g/0,0001 g

Výrobca: Sartorius AG, SRN

- Displej 16,5 mm
- Sklenený ochranný kryt proti prievanu - 3 posuvné dvierka
- Priemer misky 90 mm
- Sériové komunikačné rozhranie RS 232
- Programy - % váženie, počítanie kusov, atď.
- Možnosť voľby váhových jednotiek užívaných vo svete
- Rozlíšenie: 0,1 mg
- Min.- max. navážka: 10 – 210 g

Transiluminátor

Výrobca: ULTRA LUM , USA

Model: MEB-15 UV

- 15 x 15 cm transiluminátor, 312 nm
- z nehrdzavejúcej nerezovej ocele, UV štít
- Hmotnosť: 11 kg
- Elektrické napájanie: 115V/2A

LightCycler (real – time PCR)

Výrobca: ROCHE INSTRUMENT CENTER AG, Švajčiarsko

Model: LightCycler 1,5

Rozmery (šxvxh): 30x40x45 cm

Váha: 20 kg

Energ. napájanie: 115/230 V, 8 A, 47 – 63 Hz

Spotreba energie: max. 800 VA

Hladina hluku: < 60 dBA

Emisie tepla: 3060 KJ/h (max); 2100 KJ/h (priemerná hodnota počas operácie)

Kapacita vzoriek: 32 (1 cyklus)

Objem vzoriek: 20 µl

MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler

Výrobca: BIO-RAD Laboratories, Inc.

Model: PTC-1148 MJ Mini Thermal Cycler

Teplotný rozsah: 0 – 99,9 °C, nie nižšie ako 30 °C pod okolitú teplotu prostredia

Teplotná presnosť: ± 0,2 °C programovaného cieľa @ 90 °C, NIST-vystopovateľný

Teplotná rovnomernosť: ± 0,4 °C

Kapacita vzoriek: 48 x 0,2 ml skúmaviek, 12 x 0,5 ml skúmaviek

Frekvencia: 50 – 60 Hz

Výkon: 400 W maximum

Display: 64 x 128 LCD

Pamäť: 400 typických programov v 12 súboroch

Váha: 4,1 kg

Rozmery (šxvxh): 18x32x20 cm

NucleoSpin® Food Column Kit

Technológia: kremíková membrána

Formát: mini stočené kolóny

Vzorka: 5 – 200 mg

Veľkosť fragmentov: 300 bp – približne 50 kbp

Výtlačok: 0,1 – 10 µg

A260/A280 1,6 – 1,9

Elučný objem: 100 µL

Čas prípravy: 30 min/6 preps

Kapacita väzieb: 30 µg

Vyhodnotenie pripravených vzoriek

Laboratórna analýza pripravených vzoriek bola vykonaná za použitia vybraných detekčných metód:

1. klasická PCR (end-point PCR)
2. real-time PCR
 - SYBRGreen® Real-Time PCR
 - EvaGreen® Real-Time PCR

V prípade použitých analytických metód ide o metódy v praxi najčastejšie používané k detegovaniu prítomnosti rôznych neziaducich látok v poľnohospodárskych, ako aj potravinárskych produktoch. Z pohľadu alergickej časti ľudskej populácie, teda

nežiaducej prítomnosti potravinových alergénov, sa jedná o alergény prítomné v produktoch buď v podobe prirodzene obsiahnutých surovín, alebo ako dôsledok krížovej kontaminácie v priebehu výroby, transportu. V prípade každej z použitých metód sme poukázali na klady a/alebo zápory použitej metódy.

Klasická PCR (end-point PCR)

PCR reakcia

PCR reakcia vo finálnej fáze prebiehala za týchto podmienok: veľkosť výslednej vzorky 30 μl . Každá reakcia obsahovala 1x reakčný pufr pre polymerázu (Qiagen); 1,5 $\text{mmol.l}^{-1}\text{MgCl}_2$; mix 0,2 mmol.l^{-1} ; 0,50 $\text{pmol.}\mu\text{l}^{-1}$; 5 U HotStarTaq DNA polymerázy a 2 μl roztoku templátovej DNA. PCR reakcia prebiehala na prístroji MiniCycler™ PT-150. PCR cyklus začína pre-denaturáciou na teplote 95 °C po dobu 5 minút. Následne bolo zopakovaných 38 cyklov s teplotným profilom (30 sekúnd pri 94 °C (denaturácia), 30 sekúnd pri 59 °C (annealing), 1 minúta pri 72 °C) a finálna polymerizácia 8 minút pri 72 °C.

Gélová elektroforéza – na vizualizáciu fragmentov DNA PCR reakcie sme použili 1 % - ný agarózový gél. Pri optimalizácii metódy sme použili ako farbivá etídiumbromid, ale aj farbivo GelRed™. Na výrobu 1 % - ného agarózového gélu sme použili 1 g agarózy SERVA pre analýzu DNA, ktorú sme zmiešali s pufrom TAE Tris-Acetat-EDTA-Buffer SERVA, ktorý je desaťkrát koncentrovanej. Zloženie pufru je nasledovné: 0,4 M Tris; 0,01 M EDTA - 2 Na - soľ; 1 M ľadová kyselina octová vo vodnom roztoku. Výroba agarózového gélu: 1 g agarózy SERVA a 10 ml TAE pufru a doplnili sme na objem 100 ml destilovanou vodou. Roztok sme zahriali na teplotu 80 °C a po ochladení sme pridali 10 μl etídiumbromidu a 1 μl GelRed™. Pripravenú zmes sme naliali do vaničky na elektroforézu a vložili sme do nej hrebene na vytvorenie jamiek. Gél sa nechal vytuhnúť a následne sa pipetovali vzorky. Vzorka DNA na gél bola 10 μl a 3 μl hmotnostného DNA markéra (100 bp). Vizualizácia fragmentov DNA sa vykonala pomocou UV vizualizátora.

Tabuľka 6 Protokol na výrobu mastermixu pre reakciu PCR (primér celF, celR)

Zloženie mastermixu		Zásob. koncentr.	Výsled. koncent.	µl/vzorka
	Red. H ₂ O			16,62
134	GoTaqgreenpufor 5x	5x	1x	6
180	GoTaq MgCl ₂ 25mM	25,0 mM	1,50 mM	1,8
220	AB dNTP mix 10mM	12,5 mM	0,20 mM	0,48
186	celR	10,0	0,50	1,5
187	celF	10,0pmol/	0,50	1,5
179	GoTaqHotStartPolymerase	5,0 U	0,50 U	0,10
	DNA			2
celkom				30

EvaGreen[®] Real-Time PCR

Reakčná zmes na jednu vzorku pre PCR v celkovom objeme 20 µl bola pripravená z 10 µl Fast EvaGreen[®] qPCR Master Mix (Biotium); 6 µl bidestilovanej H₂O; 2 µl templátovej DNA a prajmermi celF a celR po 1 µl, tak ako to stanovuje výrobca v užívateľskom manuáli.

Tabuľka 7 Zloženie Fast EvaGreen[®] mastermixu pre vzorku

Komponenty PCR reakcie	Koncentrácia zásobného roztoku	Koncentrácia použitého roztoku
Fast EvaGreen [®] qPCR Master Mix	2x	1x
celF	10 pmol/µl	0,50 pmol/µl
celR	10 pmol/µl	0,50 pmol/µl

SYBRGreen[®] Real-Time PCR

Reakčná zmes na jednu vzorku pre PCR v celkovom objeme 20 µl bola pripravená z 2 µl SYBRGreen I; 0,8 µl SYBR MgCl₂; 13,2 µl SYBR H₂O; 2 µl templátovej DNA a prajmermi celF a celR po 1 µl, tak ako to stanovuje výrobca v užívateľskom manuáli.

Tabuľka 8 Zloženie SYBRGreen[®] mastermixu pre vzorku

Komponenty PCR reakcie	Koncentrácia zásobného roztoku	Koncentrácia použitého roztoku
SYBRGreen I	10x	1x
SYBR MgCl ₂	25mM	1mM
celF	10 pmol/μl	0,50 pmol/μl
celR	10 pmol/μl	0,50 pmol/μl

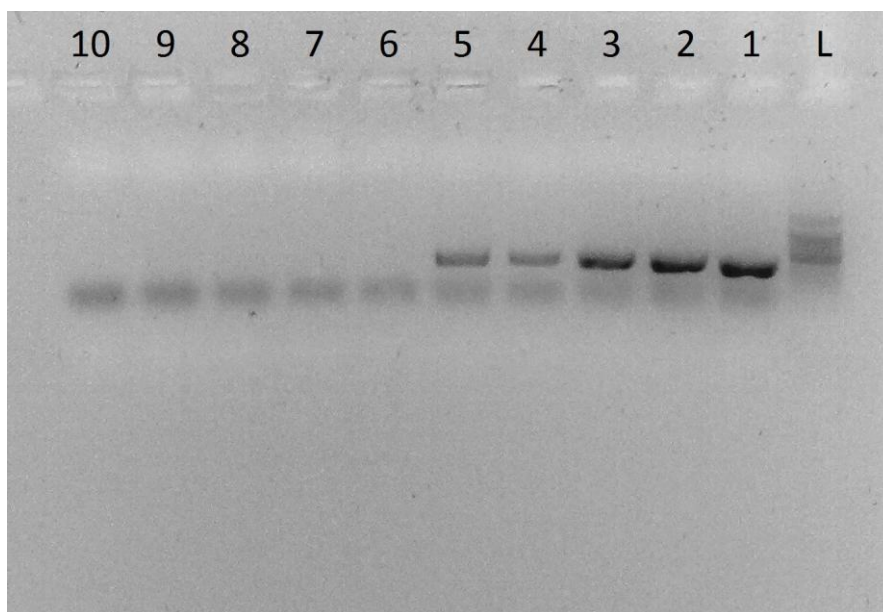
PCR reakcia bola zahájená počiatočnou denaturáciou prebiehajúcou pri teplote 95 °C po dobu 5 minút a následne v 40 cykloch (EvaGreen[®] Real-Time PCR) a v 50 cykloch (SYBRGreen[®] Real-Time PCR) v týchto troch krokoch: denaturácia pri 94 °C po dobu 30 sekúnd, annealing pri 59 °C po dobu 30 sekúnd, polymerizácia pri 72 °C po dobu 1 minúty, po ktorej nasledovalo meranie fluorescence. V ďalšom kroku nasledovala konečná polymerizácia pri 72 °C po dobu 8 minút, po ktorej prebiehal melting pri teplote 95 °C s následným ochladením na 65 °C s výdržou 15 sekúnd. Real-Time PCR prebiehala v prístroji LightCycler 1,5 (Roche). Analýza vzoriek bola vykonaná v programe LightCycler Software 4.05 pomocou procedúry „Absolute Quantification“ a „T_m Calling“. Získané dáta boli spracované do tabuliek v programe EXCEL 2007.

4 Výsledky a diskusia

Identifikáciu detekčného limitu zeleru pomocou klasickej PCR metódy (end-point); dôkaz prítomnosti zeleru v koreniách pomocou klasickej PCR metódy; identifikáciu detekčného limitu zeleru pomocou real-time PCR s využitím EvaGreen[®] Real-Time PCR a SYBRGreen[®] Real-Time PCR a dôkaz prítomnosti zeleru v koreniách pomocou real-time PCR s využitím EvaGreen[®] Real-Time PCR a SYBRGreen[®] Real-Time PCR sme uskutočnili v laboratóriách Katedry hygieny a bezpečnosti potravín, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre. Pracovisko bolo vybavené všetkou potrebnou analytickou technikou k uskutočneniu vytýčených cieľov.

Experiment 1: Identifikácia detekčného limitu zeleru pomocou klasickej PCR

Obrázok 4 Vizualizácia fragmentov zeleru na agarózovom géle



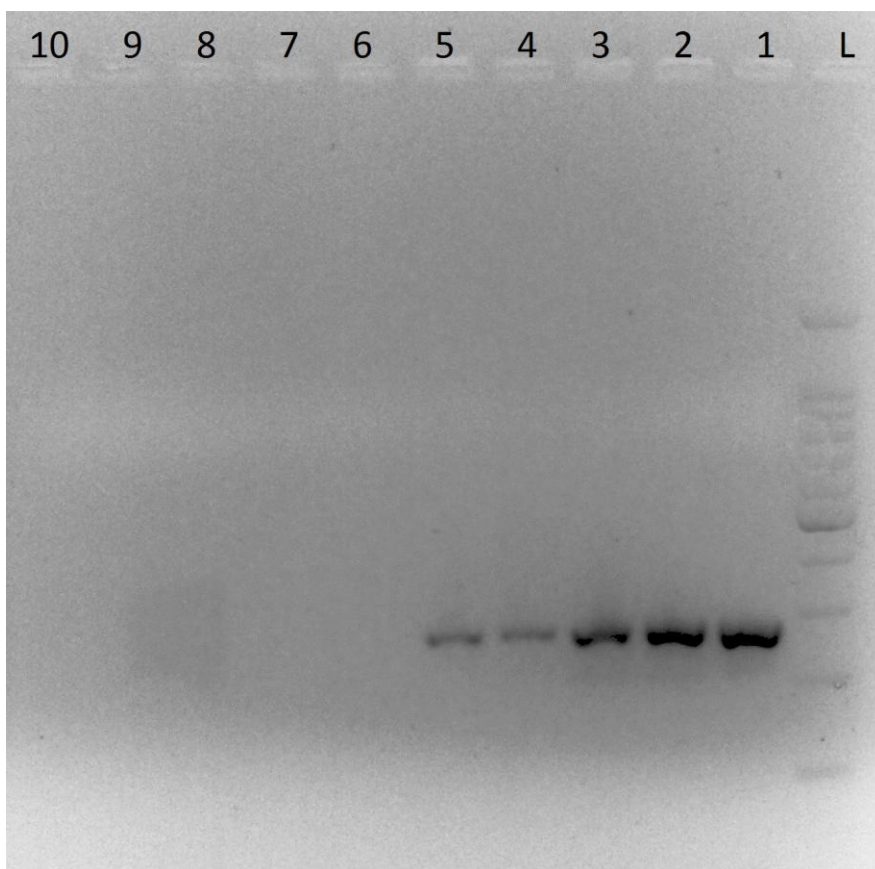
V dráhe L je použitý Bench Top Ladder 100 bp o objeme 3 μ l. V dráhe 1 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 100 %. V dráhe 2 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 10 %. V dráhe 3 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 1 %. V dráhe 4 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 0,1 %. V dráhe 5 bola použitá vzorka

s koncentráciou zeleru 0,01 %. V dráhe 6 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 0,001 %. V dráhe 7 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 0,0001 %. V dráhe 8 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 0,00001 %. V dráhe 9 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 0,000001 %. V dráhe 10 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 0 % vo forme destilovanej vody ako negatívna kontrola. Vzorky boli pipetované v objeme 10 μ l. Elektroforéza trvala 15 min. pri 150 V.

Vo vzorkách 1 až 5 sme detegovali prítomnosť zeleru, s koncentráciou obsahu zeleru od 100 % do 0,01 %. Vizualizáciu pomocou elektroforézy na agarózovom géle sme stanovili detekčný limit 0,01 %.

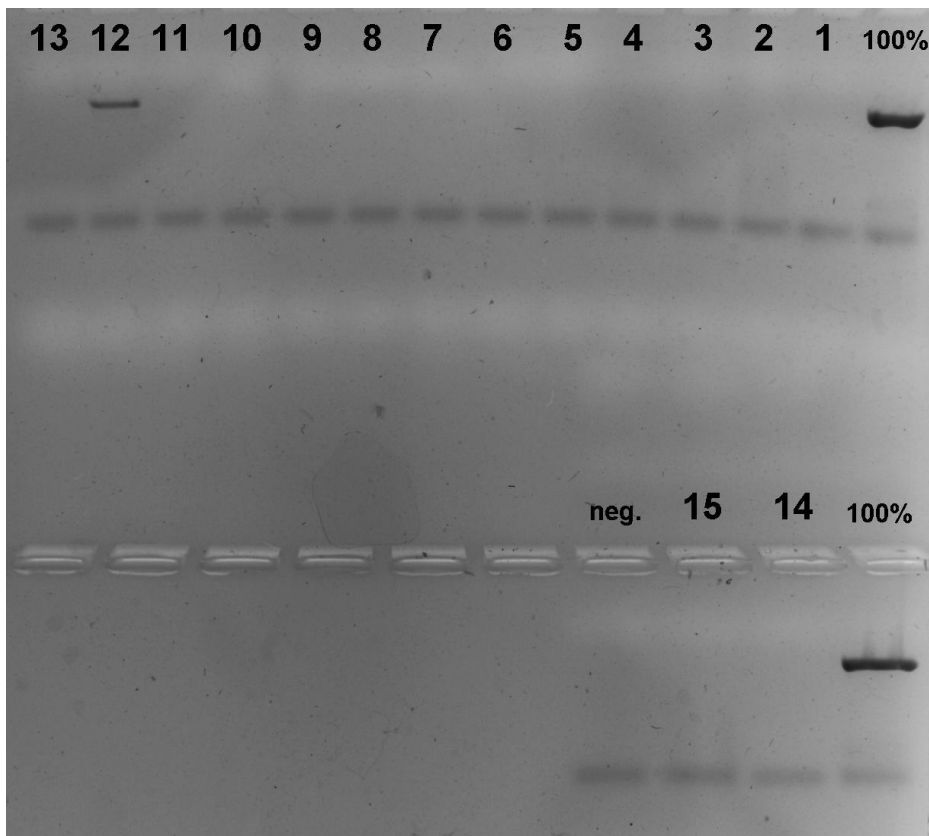
Potvrdenie výsledkov zobrazuje aj obrázok 5, pričom elektroforéza trvala 65 min. pri 125 V. Pri vizualizácii sa nám osvedčil dlhší čas pôsobenia s nižším napätím oproti kratšiemu času s vyšším napätím.

Obrázok 5 Vizualizácia fragmentov zeleru na agarózovom géle



Experiment 2: Dôkaz prítomnosti zeleru vo vzorkách korenín pomocou klasickej PCR

Obrázok 6 Vizualizácia fragmentov zeleru vo vzorkách korenín na agarózovom géle



V dráhe 1 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 100 %. V dráhe 2 bola použitá vzorka 1 Fenikel, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 3 bola použitá vzorka 2 Kôpor sušený, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 4 bola použitá vzorka 3 Aníz, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 5 bola použitá vzorka 4 Koriander mletý, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 6 bola použitá vzorka 5 Rasca celá, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 7 bola použitá vzorka 6 Karí – zmes korenia, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 8 bola použitá vzorka 7 Pasta na sečuánsku ostrokyslú polievku, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 9 bola použitá vzorka 8 Tandoori Tikka marináda, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 10 bola použitá vzorka 9 Červená Curry pasta

na spôsob country, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 11 bola použitá vzorka 10 Červená Curry pasta, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 12 bola použitá vzorka 11 Koreninová zmes na opečenú orientálnu ryžu, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 13 bola použitá vzorka 12 Sladko - kyslá koreniaca zmes, pričom vzorka bola pozitívna na obsah zeleru. V dráhe 14 bola použitá vzorka 13 Čínska zmes piatich korení (Pae-Lo korenie), pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 15 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 100 %. V dráhe 16 bola použitá vzorka 14 Koreninová zmes na pečené kura, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 17 bola použitá vzorka 15 TANDOORI MASALA grilovacie korenie, pričom vzorka neobsahovala stopy zeleru. V dráhe 18 bola použitá vzorka s koncentráciou zeleru 0 % vo forme destilovanej vody ako negatívna kontrola. Vzorky boli pipetované v objeme 10 μ l. Elektroforéza trvala 30 min. pri 125 V.

Vizualizáciu pomocou elektroforézy na agarózovom géle sme stanovili detekčný limit pre zeler 0,01 % (100 ppm (mg/kg)). **Dovičovičová et al. (2004)** vo svojej práci, zameranej na dôkaz zeleru za pomoci PCR s vizualizáciou na gély uvádzajú rovnaký detekčný limit s použitým rovnakých prajmerov. Pri vizualizácii sa nám osvedčil dlhší čas pôsobenia s nižším napätím oproti kratšiemu času s vyšším napätím. Klasickú PCR sme použili na kvalitatívnu analýzu zeleru a korenín. Nakoľko prahová hodnota pre spustenie alergickej reakcie po požití zeleru je 0,7 g a nie je legislatívne stanovený limit, metóda je dostatočne citlivá na zisťovanie prítomnosti/nepřítomnosti zeleru v potravinách. Navyše klasická PCR je metóda pomerne rýchla a cenovo dostupná s využitím bežne a cenovo dostupných chemikálií.

Tabuľka 9 Finančné náklady klasickej PCR metódy

Finančné náklady na spotrebný materiál			
názov	jednotková cena v EUR	spotrebovaný počet/vzorka	suma v EUR
kit na izoláciu DNA	4	1x	4
špičky 10-1000 µl sterilné	0,050	10ks	0,50
etanol 96 %	27,12	400µl	0,0014
ependorfky	0,01	4 ks	0,04
destilovaná voda	0,53	16,62 µl	0,003
stripy	0,05	1ks	0,05
chemikálie do reakcii PCR	0,7	1x	0,7
1% agarózový gél	0,1	1x	0,1
primery	0,2	1x	0,2
Celkové náklady na spotrebný materiál (jedna vzorka)			5,59
Finančné náklady na technické vybavenie			
názov	jednotková cena v EUR	použitý počet/vzorka	Suma v EUR
termostat	985	1x	985
chladnička s mrazničkou	350	1x	350
pipety 100-1000 µl	135	1x	135
pipety 10-100 µl	125	1x	125
pipety 0,5-10 µl	125	1x	125
vortex	250	1x	250
centrifuga	1725	1x	1 725
stopky	17	1x	17
kvantifikácia DNA	3000	1x	3 000
cyklér	3000	1x	3 000
elektroforéza	500	1x	500
iluminátor	500	1x	500
Celkové náklady na technické vybavenie (jedna vzorka)			10 712

Experiment 3: Identifikácia detekčného limitu zeleru pomocou Real-Time PCR s využitím EvaGreen[®] Real-Time PCR a SYBRGreen[®] Real-Time PCR

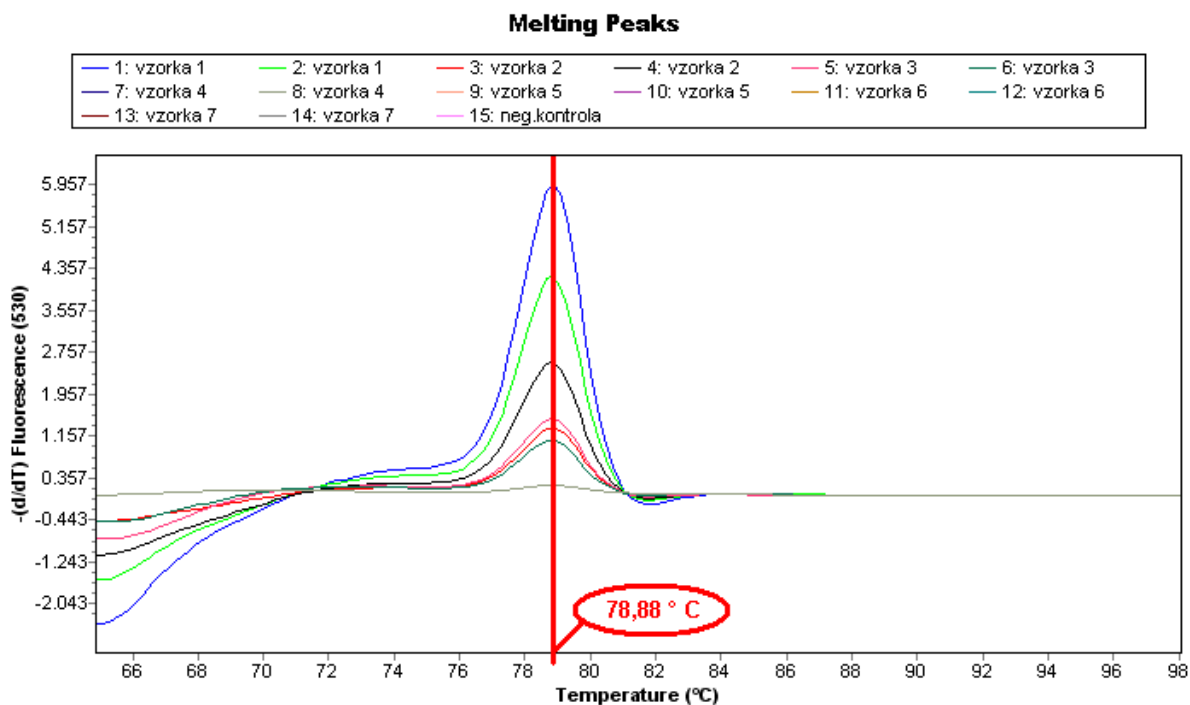
Tabuľka 10 Identifikácia detekčného limitu zeleru pomocou Real-Time PCR s využitím EvaGreen[®] Real - Time PCR a SYBRGreen[®] Real-Time PCR

Obsah zeleru vo vzorke [%]	EvaGreen [®] Real-Time PCR	SYBRGreen [®] Real-Time PCR
100	+	+
10	+	+
1	+	+
0,1	+	-
0,01	-	-
0,001	-	-
0,0001	-	-
0,00001	-	-
0,000001	-	-
0	-	-

V tabuľke 10 môžeme vidieť porovnanie detekčného limitu rovnakých vzoriek dvomi rozdielnymi metódami. Pri EvaGreen[®] Real-Time PCR sme stanovili detekčný limit pre zeler 0,1 % a pri SYBRGreen[®] Real-Time PCR sme stanovili detekčný limit pre zeler 1 %.

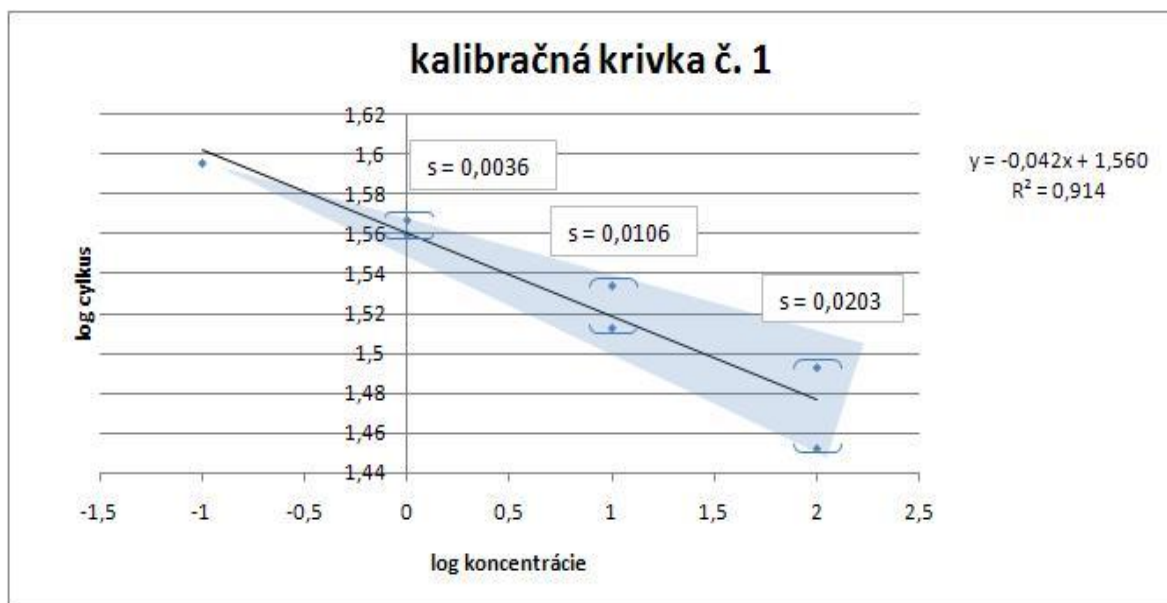
Detekcia zeleru - EvaGreen® Real-Time PCR

Obrázok 7 Krivka topenia zeleru pri použití EvaGreen® Real-Time PCR



Po ukončení PCR sme vykonali analýzu amplifikovaných fragmentov DNA zeleru na základe stanovenia závislosti fluorescence od teploty (melting curve analysis). Teplota topenia (T_m) DNA fragmentov zeleru dosiahla pri vzorke č. 1 (100 % zeler) hodnotu 78,90 °C a 78,84 °C; pri vzorke 2 (vzorka s koncentráciou zeleru 10 %) sme zaznamenali T_m o hodnote 78,89 °C a 78,83 °C; pri vzorke 3 (vzorka s koncentráciou zeleru 1 %) sme zistili T_m o hodnote 78,87 °C a 78,86 °C, pri vzorke 4 T_m (vzorka s koncentráciou zeleru 0,1 %) mala hodnotu 79,01 °C. Priemerná teplota topenia DNA fragmentov zeleru dosiahla pri použití interkalačného farbiva EvaGreen® Real-Time PCR hodnotu 78,88 °C.

Obrázok 8 Kalibračná krivka detekcie zeleru - EvaGreen® Real-Time PCR

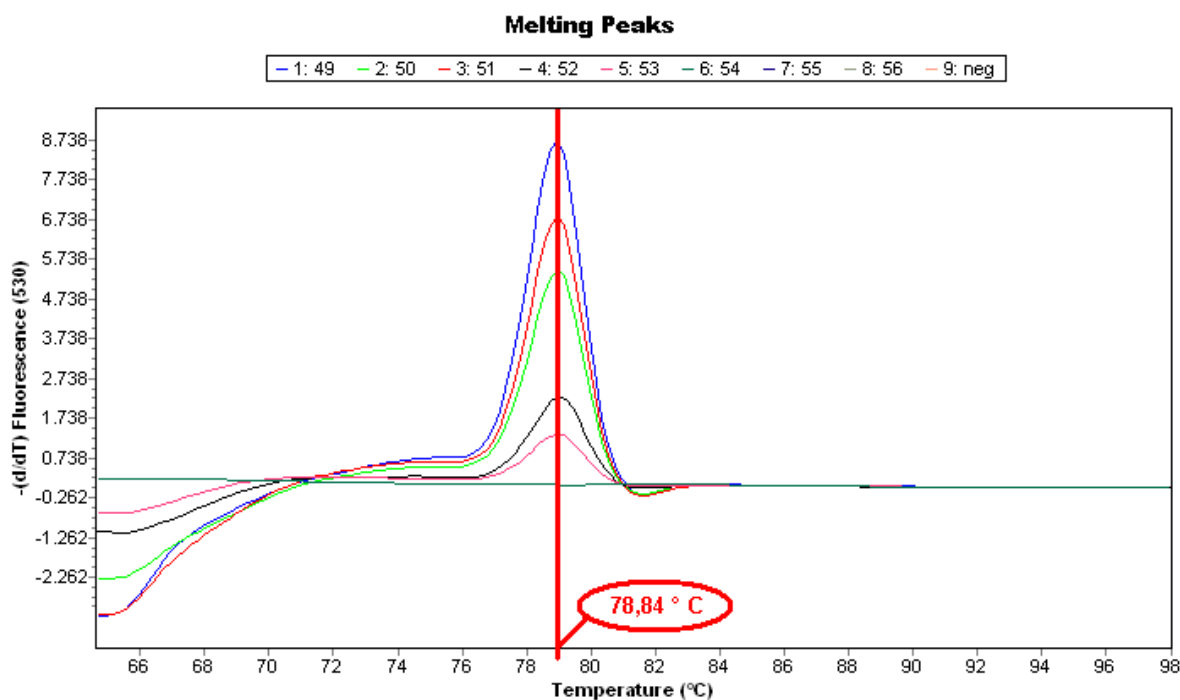


Na osi x sú logaritmované hodnoty koncentrácie zeleru vo vzorke a na osi y je logaritmus cyklu, v ktorom vzorka prekročila nešpecifické pozadie. Na základe koncentrácie PCR produktu v jednotlivých cykloch sme zostavili kalibračnú krivku, ktorej smerodajné odchýlky sa znižujú od 100 % čistej kontrolnej vzorky smerom k riedenej 0,1 % vzorke zeleru. Z toho vyplýva, že keď stanovujeme v detekčnom limite (do 0,1 %) vzorku, najmenšia odchýlka bude pri najviac riedenej vzorke a naopak najväčšia je pri 100 % čistej kontrolnej vzorke zeleru. Dochádza však ku kalibračnej chybe pri paralelných vzorkách. Determinačný koeficient je vysoký, z čoho vyplýva že regresná rovnica je vhodná na predpovedanie hodnoty y s percentom pravdepodobnosti 95,6 %.

Tabuľka 11 Logaritmicke hodnoty pre kalibračnú krivku detekcie zeleru - EvaGreen® Real-Time PCR

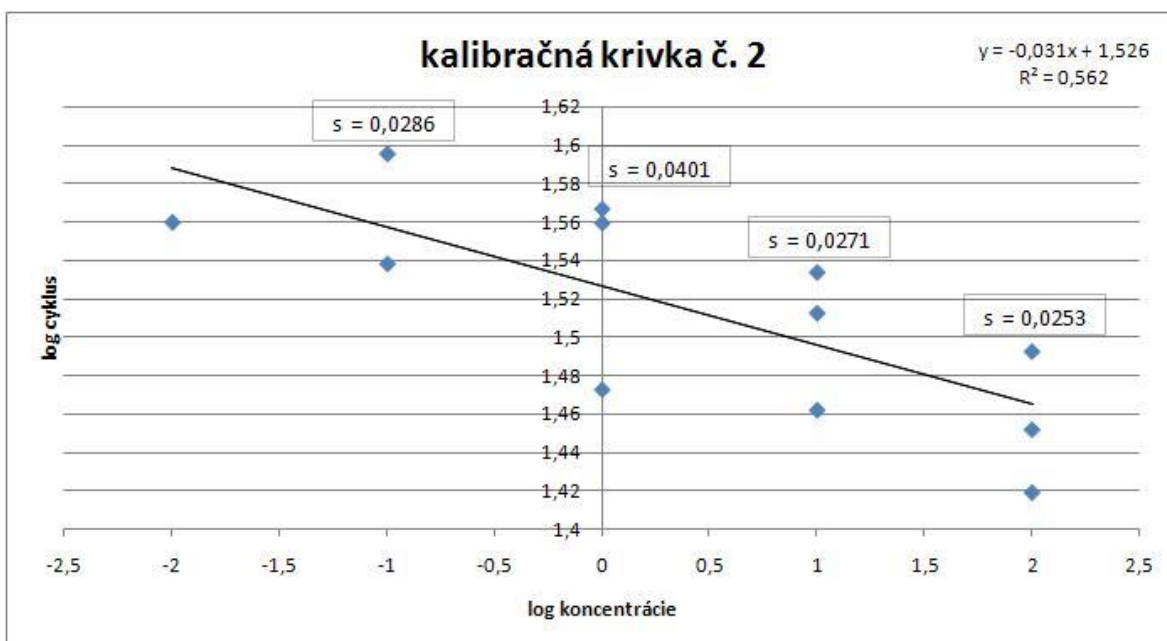
Koncentrácia	Log. koncentrácie	Cyklus	Log.cyklus
100	2	28,3	1,451786
100	2	31,08	1,492481
10	1	34,17	1,533645
10	1	32,54	1,512418
1	0	36,25	1,559308
1	0	36,87	1,566673
0,1	-1	39,38	1,595276

Obrázok 9 Krivka topenia zeleru pri použití EvaGreen® Real-Time PCR (opakovanie)



Priemerná teplota topenia (T_m) fragmentov DNA zeleru vo vzorkách zeleru 1 až 4 s koncentráciou zeleru od 0,01 % do 100 % dosiahla hodnotu 78,84 °C.

Obrázok 10 Kalibračná krivka detekcie zeleru - EvaGreen® Real-Time PCR



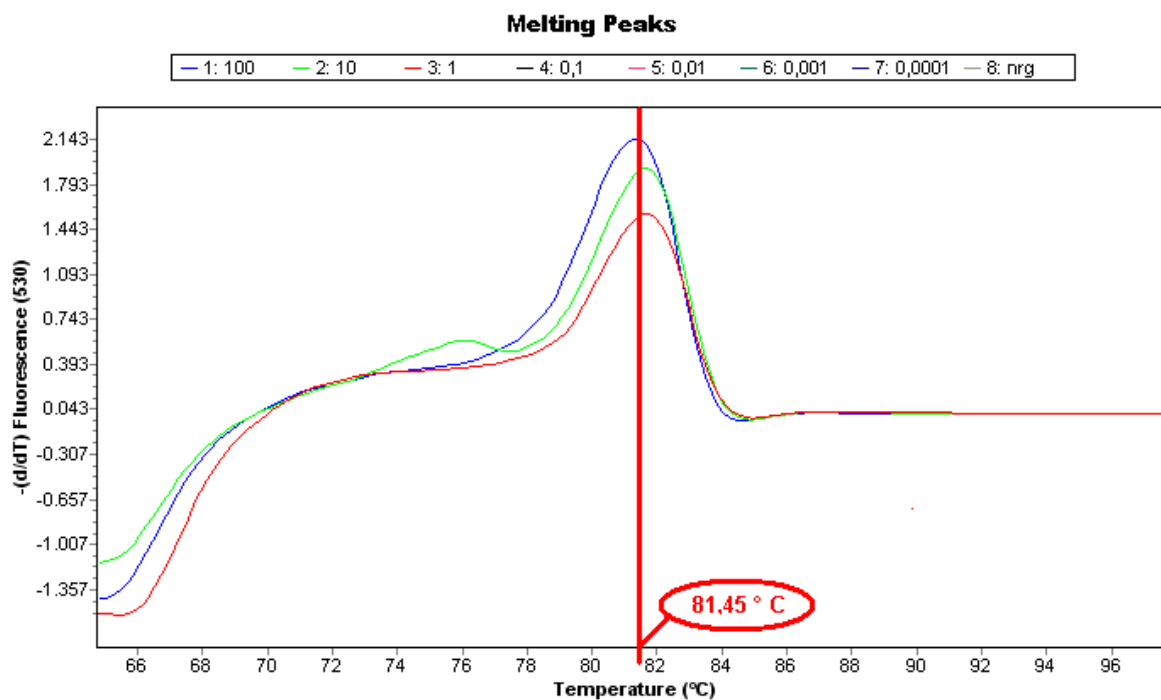
Veľká variabilita, ktorú môžeme sledovať na obrázku 10 spôsobuje, že pri opakovaných vzorkách sa síce dá vytvoriť kalibračná krivka, avšak má malú spoľahlivosť. Smerodajné odchýlky sú rozdielne, najvyššia je však pri hodnote 0, čiže pri 1 % koncentrácií zeleru vo vzorke. Pri hodnote 2, čiže vzorke s koncentráciou zeleru 100 % je smerodajná odchýlka najnižšia. Determinačný koeficient dosahuje hodnotu 0,5627, čiže percento pravdepodobnosti je 74,9 % a daná regresná rovnica sa nedá používať paušálne, teda vždy musíme pri detekcii použiť aspoň jednu kalibračnú vzorku, aby sme mohli určiť tvar kalibračnej krivky, z ktorej si potom môžeme zostaviť regresnú rovnicu, na základe ktorej budeme predpovedať hodnoty y.

Tabuľka 12 Logaritmické hodnoty pre kalibračnú krivku detekcie zeleru - EvaGreen[®] Real-Time PCR

Koncentrácia	Log. koncentrácie	Cyklus	Log. cyklus
100	2	28,3	1,451786
100	2	31,08	1,492481
100	2	26,25	1,419129
10	1	34,17	1,533645
10	1	32,54	1,512418
10	1	28,97	1,461948
1	0	36,25	1,559308
1	0	36,87	1,566673
1	0	29,69	1,47261
0,1	-1	39,38	1,595276
0,1	-1	34,52	1,538071
0,01	-2	36,28	1,559667

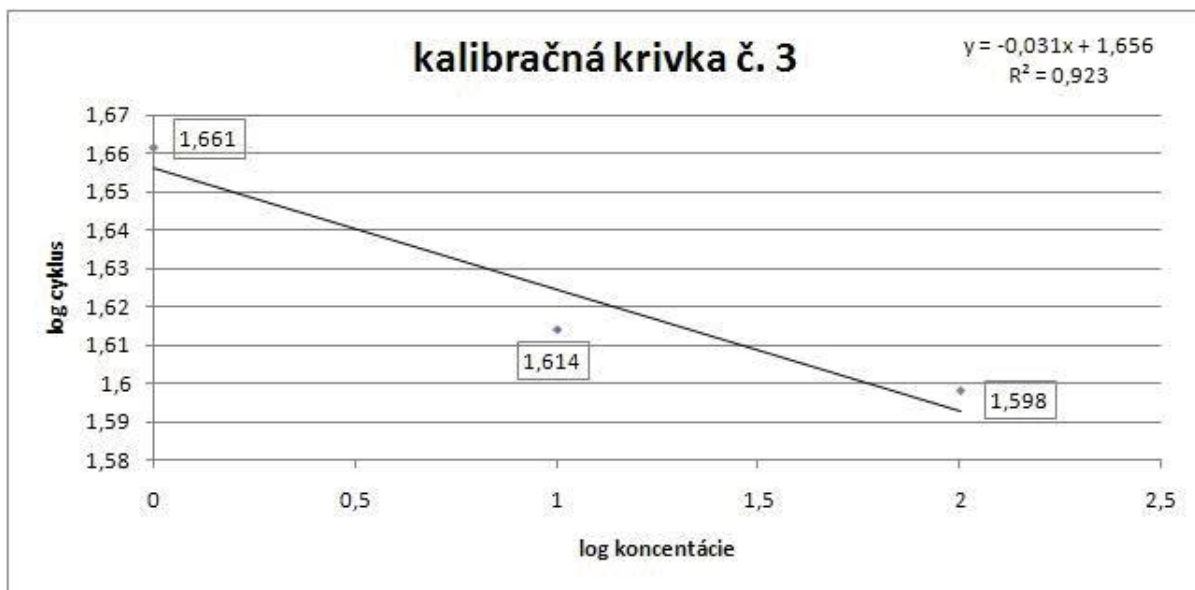
Detekcia zeleru - SYBRGreen[®] Real-Time PCR

Obrázok 11 Krivka topenia zeleru pri použití SYBRGreen[®] Real-Time PCR



Po ukončení PCR sme vykonali analýzu amplifikovaných fragmentov DNA zeleru na základe stanovenia závislosti fluorescence od teploty (melting curve analysis). Teplota topenia (T_m) DNA fragmentov zeleru dosiahla pri vzorke 1 s koncentráciou 100 % hodnotu 81,22 °C; pri vzorke 2 s koncentráciou 10 % obsahu zeleru sme zistili hodnotu T_m 81,49 °C; pri vzorke 3 s koncentráciou 1 % sme zaznamenali hodnotu T_m 81,65 °C. Priemerná hodnota teploty topenia DNA fragmentov zeleru s použitím interkalačného farbiva SYBRGreen[®] Real-Time PCR bola 81,45 °C.

Obrázok 12 Kalibračná krivka detekcie zeleru - SYBRGreen® Real-Time PCR



Determinačný koeficient dosahuje hodnotu 0,923, čiže percento pravdepodobnosti je 96 %. Napriek vysokej pravdepodobnosti, kalibračná krivka nemôže slúžiť na určovanie koncentrácie vzoriek s obsahom zeleru menej ako 1%.

Tabuľka 13 Logaritmické hodnoty pre kalibračnú krivku detekcie zeleru - SYBRGreen® Real-Time PCR

Koncentrácia	Log. koncentrácie	Cyklus	Log. cyklu
100	2	39,62	1,597914
10	1	41,10	1,613842
1	0	45,87	1,661529

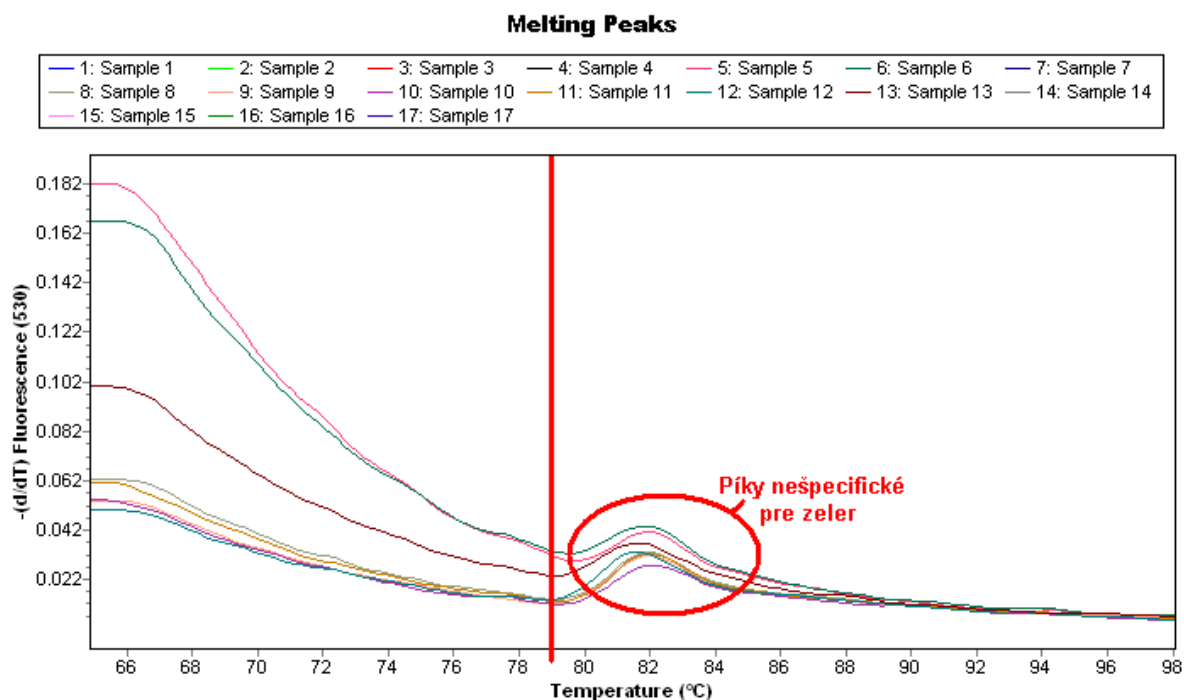
Experiment 4: Dôkaz prítomnosti zeleru v koreninách pomocou Real - Time PCR využitím EvaGreen® Real-Time PCR a SYBRGreen® Real-Time PCR

1/ Detekcia zeleru v koreninách - EvaGreen® Real-Time PCR

Tabuľka 14 Prehľad analyzovaných vzoriek korenín

Číslo vzorky:	Vzorka:
vzorka 1	Fenikel celý
vzorka 2	Kôpor sušený
vzorka 3	Aníz
vzorka 4	Koriander mletý
vzorka 5	Rasca celá
vzorka 6	Karí
vzorka 7	Pasta na sečuánsku ostrokyslú polievku
vzorka 8	Tandoori Tikka marináda
vzorka 9	Červená Curry pasta na spôsob country
vzorka 10	Červená Curry pasta
vzorka 11	Koreninová zmes na opečenú orientálnu ryžu
vzorka 12	Sladko – kyslá koreniaca zmes
vzorka 13	Čínska zmes piatich korení (Pae-Lo korenie)
vzorka 14	Koreninová zmes na pečené kura
vzorka 15	TANDOORI MASALA – grilovacie korenie
vzorka 16	zeler 100 %
vzorka 17	negatívna kontrola

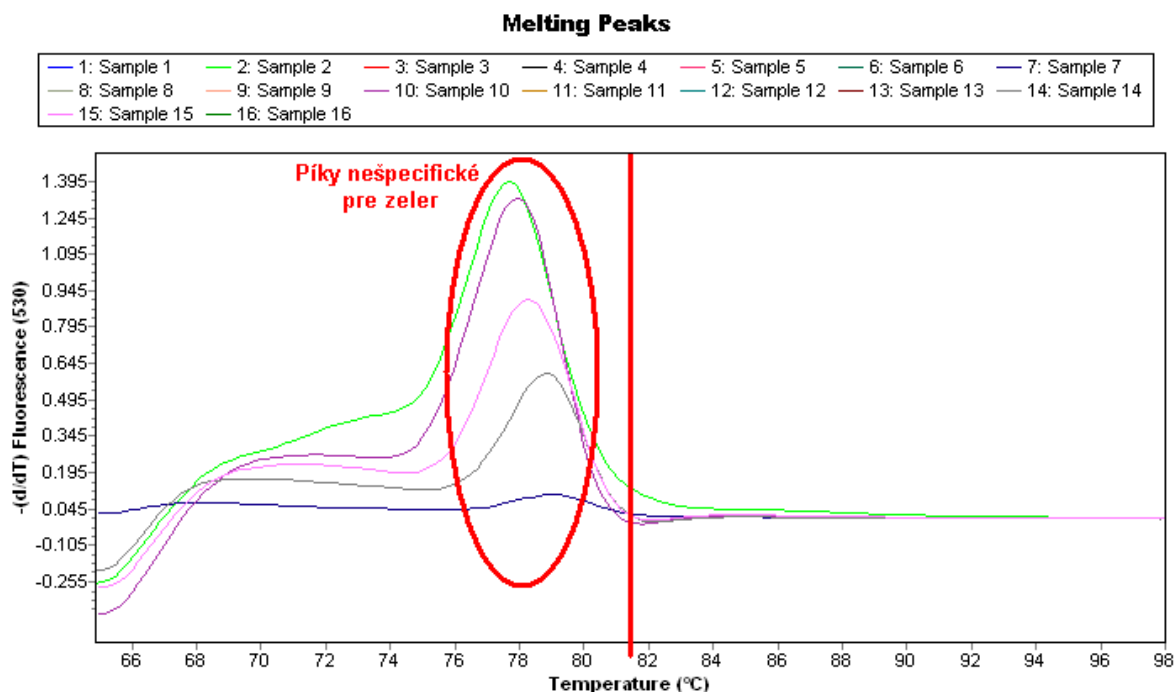
Obrázok 13 Krivka topenia PCR produktov korenín pri použití EvaGreen[®] Real-Time PCR



Pri použití EvaGreen[®] Real-Time PCR na detekciu zeleru v koreninách a koreniaciach zmesiach, sa nám zobrazili píky nešpecifické pre zeler (kde teplota topenia bola pri zeleri 78,88 °C). Zistené hodnoty môžu byť charakteristické pre príbuzné druhy korenín v rámci čeľade mrkvovité (*Apiaceae*). Zistené boli nasledujúce hodnoty teploty topenia, pri vzorke 6 Karí – zmes korenia T_m – 83,48 °C; pri vzorke 8 Tandoori Tikka marináda T_m – 82,67 °C; pri vzorke 9 Červená curry pasta na spôsob country T_m – 82,64 °C; vzorka 10 Červená curry pasta T_m – 83,0 °C; vzorka 11 Koreninová zmes na opečenú orientálnu ryžu T_m – 82,67 °C; ďalej pri vzorke 12 Sladko – kyslá koreniaca zmes T_m – 82,31 °C a vzorka 13 Čínska zmes piatich korení (Pae-Lo korenie) T_m – 82,99 °C. Tieto vzorky obsahovali okrem vzorky 9 príbuzné druhy korenín z čeľade *Apiaceae*, pričom vzorka 6 obsahovala koriander, rascu, fenikel; vzorka 8 obsahovala koriander a „korenie“ – nesprávne a neidentifikovateľné označenie zložiek; vzorka 10 obsahovala kumín; vzorka 11 obsahovala „korenie“ – nesprávne a neidentifikovateľné označenie zložiek; vzorka 12 obsahovala petržlen a vzorka 13 obsahovala koriander a aníz.

2/ Detekcia zeleru v koreninách - SYBRGreen® Real-Time PCR

Obrázok 14 Krivka topenia PCR produktov korenín pri použití SYBRGreen® Real-Time PCR



Teploty topenia vzoriek korenín nepreukázali hodnoty zistené u zeleru metódou SYBRGreen® Real-Time PCR, pri ktorej bola teplota topenia 81,45 °C. Zistené hodnoty môžu byť charakteristické pre príbuzné druhy korenín v rámci čeľade mrkvovité (*Apiaceae*). Zistené boli nasledujúce hodnoty teploty topenia, pri vzorke 2 Kôpor sušený $T_m - 77,84$ °C; vzorka 7 Pasta na sečuánsku ostrokyslú polievku $T_m - 68,84$ °C; vzorka 10 Červená Curry pasta $T_m - 78,01$ °C; vzorka 14 Koreninová zmes na pečené kura – $T_m 78,95$ °C; vzorka 15 TANDOORI MASALA – grilovacie korenie $T_m - 78,44$ °C. Vzorky 2, 10, 14 a 15 obsahovali príbuzné druhy z čeľade *Apiaceae* deklarované na zložení, pričom sa jednalo o kôpor (vzorka 2), kumín (vzorka 10), koriander (vzorka 14), kumín a koriander (vzorka 15).

Podľa Sandberga et al. (<http://www.slv.se>), ELISA testy pozitívne detegovali okrem zeleru i obsah petržlenu v koreniacej zmesi s cesnakom a bylinkami, ďalej obsah mrkvy a paštrnáku v instantnej polievke s brokolicou a pórom, petržlenu v bylinkovej soli, mrkvy a paštrnáku vo vegetariánskej strave, mrkvy v sladko – kyslej omáčke, mrkvy,

kapusty a paštrnáku v mäsovom vývare so zeleninou a mrkvy v detskej výžive. Vo väčšine vzorkách, práve mrkva bola dôležitou súčasťou, ktorá krížovo reagovala s protilátkou vzorky, taktiež vzorky reagovali i s paštrnákom a petržlenom.

Hrubíško et al. (2003) v rámci poznatkov z alergológie uvádza, že hlavné alergény sú v jednotlivých druhoch koreňovej zeleniny (mrkva, paštrnák, petržlen, zeler) a v korení z mrkvovitých rastlín (aníz, fenikel, koriander, kôpor, kumín, rasca, ligurček) homológne, preto sú skrížené alergické prejavy časté.

Podľa záverov Vedeckého panelu EFSA pre dietetické produkty, výživu a alergie zo dňa 19. februára 2004, bolo vykonaných niekoľko štúdií s cieľom determinovať minimálne tolerovateľné dávky u pacientov citlivých na zeler, ktoré demonštrovali, že orálny alergický syndróm je vyvolaný pri nízkych dávkach zeleru (0,7 – 2,7 g), zatiaľ čo symptómy po konzumácii zeleru sa pohybovali pri dávkach od 7,5 g do 31 g. Prahové hodnoty boli podobné u vareného zeleru, zatiaľ čo zelerové korenie spustilo objavenie systémových symptómov pri veľmi nízkych dávkach 0,16 – 5,85 g (**The EFSA Journal, 2004**). Zároveň v roku 2004 Vedecký panel skonštatoval, že v oblasti analytických metód detekcie zeleru v potravinách nie je k dispozícii spoločná metóda pre kvantifikáciu zeleru v potravinách. Podľa **Balmer – Webera et al. (2000)**, minimálna dávka čerstvého zeleru, ktorá spúšťa alergickú reakciu je 0,7 g. Codex Alimentarius FAO/WHO vo všeobecnom štandarde pre označovanie potravín (Codex STAN 1-1985) upravuje označovanie potravín a ich zložiek, ktoré spôsobujú hypersenzitivitu a musia byť vždy na obale deklarované, kategorizuje osem skupín alergénov (obilniny obsahujúce glutén; kôrovce a výrobky z nich; vajcia a vaječné výrobky; ryby a výrobky z nich; arašidy, sóju a výrobky z nich; mlieko a mliečne výrobky; orechy a výrobky z nich a oxid siričitý v koncentrácii 10 mg/kg⁻¹ alebo viac. FAO/WHO a komisia Codex Alimentarius nezaraďuje zeler do skupiny potravinových alergénov. Nakoľko závery Codex Alimentarius majú medzinárodný, ale odporúčací charakter, legislatíva je v globálnom celosvetovom meradle v podstate harmonizovaná, avšak v prípade niektorých alergénov, vrátane zeleru sa zohľadňujú národné špecifiká, čoho príkladom je i legislatíva Európskej únie.

V rámci experimentu sme identifikovali detekčný limit zeleru metódou real-time PCR s použitím rozdielnych farbív EvaGreen[®] Real-Time PCR a SYBRGreen[®] Real-Time PCR. Obidve farbivá sú interkalačné farbivá DNA používané pri real-time PCR, pričom tieto látky sa včleňujú (interkalujú) medzi dve susedné bázy.

Pri použití metódy real-time PCR a farbiva SYBRGreen[®] Real-Time PCR bol zistený detekčný limit pre zeler 1 %, pri použití farbiva EvaGreen[®] Real-Time PCR bol zistený detekčný limit 0,1 %.

Lepšie výsledky, detekčný limit zeleru 0,1 % sme dosiahli pri použití farbiva EvaGreen[®] Real-Time PCR. Podľa portálu (www.biotium.com) a uvedených výsledkov z porovnania dostupných farbív pre real-time PCR z februára 2011, je EvaGreen[®] farbivo ďalšia generácia DNA – viažuceho farbiva s vlastnosťami použiteľnými pre kvantitatívnu real-time PCR a pre ďalšie aplikácie, ktoré je vylepšené oproti SYBRGreen[®]. V prvom rade je bezpečné pre životné prostredie, nie je mutagénne, cytotoxické a bezpečné pre vodný život. EvaGreen[®] mastermix je formulovaný s relatívne vysokou koncentráciou farbiva s cieľom maximalizovať fluorescenčný signál bez PCR inhibície. EvaGreen[®] je stabilný počas skladovania a pri podmienkach PCR reakcie. SYBRGreen[®] je pokladaný za dokonca viac environmentálne toxický než etídiumbromid, ktorý je jeden z najznámejších mutagénov. Dostatočné množstvo farbiva v mastermixe je nevyhnutné pre generovanie dobrého signálu. Pre veľa používaných PCR farbív ako je SYBRGreen[®], je optimálna koncentrácia farbiva celkom nízka, čo limituje PCR signál a zároveň sú farbivá nevhodné pre HRM (high-resolution melt curve) analýzu. Environmentálne pozitívne vlastnosti farbiva EvaGreen[®], aj nami potvrdená vyššia citlivosť metódy real-time PCR pri jeho použití, dáva predpoklad pre jeho využitie v laboratóriách potravinárskych podnikov, nakoľko sa eliminuje negatívny dopad na životné prostredie, riziká pri likvidácii laboratórneho odpadu, možná kontaminácia zdrojov pitnej vody atď.

Wu et al. (2010) sa zameriavali na SYBRGreen[®] Real-Time PCR a ich detekčný limit pri surovom zeleri bol 0,001 % a pri tepelne ošetrovaných vzorkách 0,01 %.

Hupfer et al. (2006) detegovali pomocou real-time PCR, LOD pre zeler v mäsových výrobkoch, v salámach emulzného typu s hodnotou 5 - 10 mg/kg (0,0005 – 0,001 %) zeleru s použitím iných prajmerov zeleru, aké boli použité v tejto práci.

Sandberg et al. (2009) uvádzajú detekčný limit pomocou real-time PCR pre zeler 0,001 % v mäsových výrobkoch, čo zodpovedá 10 ppm (mg/kg), ktorý dosiahli pri použití iných prajmerov a s inou dĺžkou - 113 bp.

Na obale ani jednej z analyzovaných vzoriek v rámci práce nebol deklarovaný obsah zeleru, ani sa metódami použitými v rámci práce výskyt zeleru nepotvrdil. Označenie výrobcom „Výrobok môže obsahovať stopové množstvá zeleru, horčice, sezamového

semienka a gluténu“ upozorňuje osoby hypersenzitívne na zeler. V rámci výroby a technológie spracovania korenín môže dôjsť ku krížovej kontaminácii produkcie, pričom prahová hodnota prípustnej kontaminácie, ako je napr. u geneticky modifikovaných potravín a krmív (0,9% zložiek potraviny podľa čl. 12 nariadenia (ES) č. 1829/2003 Európskeho Parlamentu a Rady o geneticky modifikovaných potravinách a krmivách), kedy podľa nariadenia ich prítomnosť je náhodná a technologicky nevyhnutná, tiež nie je pre zeler legislatívne stanovená.

Kuchta et al. (2005a) uvádza, spomedzi viacerých navrhnutých spôsobov sa na analýzu potravín ukazuje ako najvhodnejšia tzv. 5' – nukleázová real-time PCR, využívajúca okrem špecifických prajmerov aj špecifické oligonukleotidové sondy označené na 5' – konci fluorescenčným farbivom a so zhášačom naviazaným na 3' – konci (tzv. sondy typu TaqMan). Oproti real-time PCR s interkalačným farbivom SYBRGreen je tento spôsob nákladnejší, ale umožňuje špecifickú detekciu amplifikovaného fragmentu DNA. Táto metóda sa v súčasnosti využíva v laboratóriách pre úradnú kontrolu potravín, je vysoko citlivá, avšak pomerne cenovo náročná.

Z údajov poskytnutých ŠVPÚ v Bratislave, ŠVPS SR v rámci úradných kontrol potravín podľa zákona NR SR č.152/1995 o potravinách v znení neskorších predpisov a PK SR, vykonala kontroly zeleru a jeho obsahu ako alergénu v potravinách nasledovne :

Tabuľka 15 Výsledky úradnej kontroly zeleru v potravinách za roky 2009 – 2011

Rok	Celkový počet vzoriek analyzovaných na obsah zeleru	Počet nevyhovujúcich vzoriek na obsah zeleru	% nevyhovujúcich vzoriek
2009	58	4	6,9
2010	45	7	15,5
2011/I.polrok	20	2	10

V kontrolách sa zameriavala na označovanie potravín v súlade s legislatívou, vyhodnocovanie vzoriek kvalitatívne (pozitívna/negatívna vzorka – metódou DNA bola/nebola detegovaná DNA zeleru), pričom na analýzu používa metódu real-time PCR s využitím TaqMan fluorescenčných sond (oligonukleotidy označené fluorescenčnými značkami: 5' - reporter a 3' - quencher).

5 Návrh na využitie výsledkov

Problematika riešenia potravinových alergií sa stáva čoraz aktuálnejšou, i vzhľadom na stúpajúci trend nárastu alergických ochorení z potravín, ktoré sa najčastejšie prejavujú ako chronické ochorenia v podobe nádchy, astmy, atopickej dermatitídy a ďalších kožných ťažkostí, gastrointestinálnych ťažkostí, ale tiež ako život ohrozujúci anafylaktický šok.

V záujme ochrany zdravia spotrebiteľa, FAO/WHO Codex Alimentarius v roku 1985 a Európska únia v roku 2003 prijali legislatívne štandardy pre povinné označovanie alergénov v potravinách.

V súčasnosti, podľa európskeho potravinového práva je výrobca povinný označovať alergénne zložky pri 14 skupinách potravín, vrátane zeleru a výrobkov z neho. Zároveň pre zeler nie je legislatívne stanovený limit, ani prahová hodnota pri výskyte náhodnej kontaminácie pri výrobe a manipulácii s ním v potravinárskych prevádzkach. Podľa záverov Vedeckého panelu EFSA pre dietetické produkty, výživu a alergie bolo vykonaných niekoľko štúdií s cieľom determinovať minimálne tolerovateľné dávky u pacientov citlivých na zeler, ktoré demonštrovali, že orálny alergický syndróm je vyvolaný pri nízkych dávkach zeleru (0,7 – 2,7 g), zatiaľ čo symptómy po konzumácii zeleru sa pohybovali pri dávkach od 7,5 do 31 g. Prahové hodnoty boli podobné u vareného zeleru, zatiaľ čo zelerové korenie spustilo objavenie systémových symptómov pri veľmi nízkych dávkach 0,16 – 5,85 g.

Okrem toho, že potravinárske prevádzky sú povinné dodržiavať požiadavky európskeho potravinového práva a harmonizovanej národnej legislatívy, pri výrobe a manipulácii s alergénnymi zložkami sa uplatňujú i ďalšie požiadavky na elimináciu rizika ako napr.:

- prevádzky musia mať účinný systém riadenia alergénov;
- v záujme vysledovateľnosti musia byť dostupné informácie o dodávateľoch potravín a špecifikácie produktov, ktoré sú zaradené medzi alergény;
- pre manipuláciu/skladovanie alergénov, musí byť vykonané hodnotenie rizika pre posúdenie možnosti krížovej kontaminácie;
- musia byť zavedené podrobné postupy k zabráneniu kontaminácie produktov;
- alergény musia byť skladované v oddelených a označených priestoroch;

- materiály obsahujúce alergény musia byť jasne označené počas skladovania a výroby, predovšetkým vtedy, ak sú materiály odokryté a či je možnosť krížovej kontaminácie;
- všetky zariadenia (vrátane výrobných liniek a pomôcok) použité pre výrobu alergénnych výrobkov musia byť pred výrobou nealergénnych výrobkov chemicky vyčistené (a pokiaľ možno rozmontované). Účinnosť čistenia musí byť overená. Obzvlášť sitá (kvôli obtiažnosti čistenia) musia byť vybrané a starostlivo vyčistené medzi alergénnymi a nealergénnymi materiálmi, prípadne môžu byť sitá určené len pre dané alergény;
- v priestoroch prípravy surovín, napr. korenín, musia byť pomôcky použité pre výrobu alergénnych produktov farebne odlišené;
- pokiaľ nie sú pre alergény vyhradené linky, produkty obsahujúce alergény musia byť naplánované na koniec výrobných dávok alebo prípadne produkty neobsahujúce alergény sú spracovávané na vyčistenej linke na začiatku zmeny;
- produkty obsahujúce alergény by mali byť vyrábané na k tomu určených linkách alebo zariadeniach;
- pracovníci manipulujúci s alergénmi musia byť zaškolení a musia byť jasne identifikovaní, napr. odevom/použitím farebných jednorazových ochranných prostriedkov.

Nami navrhovaná metodika stanovenia detekčného limitu pre zeler ako alergén a dôkaz prítomnosti zeleru v koreninách pomocou klasickej PCR s detekčným limitom 0,01 % a pomocou farbiva EvaGreen[®] Real-Time PCR s detekčným limitom 0,1 % je vhodná na overenie účinnosti systému riadenia alergénov v potravinárskych prevádzkach a aplikovateľná v potravinárskych podnikových laboratóriách. V práci používané metódy patria k relatívne rýchlym metódam, pričom sú cenovo dostupné prístroje i používané laboratórne chemikálie.

V prípade získania negatívnych výsledkov, keďže nie je legislatívne stanovená možná percentuálna hodnota z dôvodu krížovej kontaminácie, je vhodné výrobok označiť slovne v záujme ochrany zdravia jedincov hypersenzitívnych na zeler nasledovne:

- „výrobok môže obsahovať stopy zeleru“;
- „vyrobené v závode spracovávajúcom zeler“;
- alebo inou obdobou uvedených označení.

Záver

Z vykonaných experimentov môžeme prezentovať nasledujúce dosiahnuté závery: Pomocou klasickej PCR sme stanovili detekčný limit pre zeler 0,01 %. V práci sme navrhli konkrétnu metodiku s uvedením jednoduchého a praktického spôsobu prípravy vzorky a riedených koncentrácií zelerového prášku, extrakcie DNA s využitím komerčných kitov, odskúšali sme vhodnosť prajmerov na detekciu manitol dehydrogenázy s teoretickou teplotou topenia okolo 60 °C. Ďalej sme v práci navrhli prípravu a konkrétne zloženie mastermixu. Vizualizáciou pomocou elektroforézy na agarózovom géle s použitím farbív etídiumbromid, ale aj farbiva GelRed™, sme stanovili detekčný limit pre zeler 0,01 %. Pri vizualizácii sa nám osvedčil dlhší čas pôsobenia s nižším napätím (65 min. pri 125 V) oproti kratšiemu času s vyšším napätím (15 min. pri 150 V). Nakoľko prahová hodnota pre spustenie alergickej reakcie po požití zeleru je 0,7 g a nie je legislatívne stanovený limit, metóda je dostatočne citlivá na zisťovanie prítomnosti/neprítomnosti zeleru v potravinách. Navyše klasická PCR je metóda pomerne rýchla a cenovo dostupná metóda s využitím bežne a cenovo dostupných chemikálií. Klasickú PCR sme použili i na dôkaz prítomnosti zeleru v koreninách. V rámci práce bol zeler detegovaný v celkovo 15 vzorkách korenín, pričom z domácej produkcie pochádzalo 6 vzoriek, z dovozu z tretích krajín pochádzalo 8 vzoriek a jedna vzorka z krajiny EÚ. Vzorky korenín prevažne zložené z príbuzných druhov čeľade *Apiaceae* boli zakúpené v obchodnej sieti a v rámci internetového predaja. Na obale ani jednej z nich nebol deklarovaný obsah zeleru, ani sa metódami použitými v rámci práce výskyt zeleru nepotvrdil. Pri klasickej PCR síce vzorka č. 12 Sladko - kyslá koreniaca zmes bola pozitívna na obsah zeleru, obsah zeleru v tejto vzorke sa však nepotvrdil pri použití metódy real-time PCR.

Pomocou real-time PCR sme identifikovali detekčný limit zeleru s využitím rôznych interkalačných farbív EvaGreen® Real-Time PCR a SYBRGreen® Real-Time PCR a porovnali ich citlivosť a vhodnosť na použitie v podnikových laboratóriách potravinárskeho priemyslu.

Pri použití metódy real-time PCR a farbiva SYBRGreen® Real-Time PCR bol zistený detekčný limit pre zeler 1 %. Po ukončení PCR sa vykonala analýza amplifikovaných fragmentov DNA zeleru na základe stanovenia závislosti fluorescencie od teploty (melting curve analysis). Teplota topenia fragmentov DNA zeleru dosiahla hodnotu 81,45 °C.

Napriek vysokému percentu pravdepodobnosti 96 %, zostrojená kalibračná krivka môže slúžiť len na určovanie koncentrácie vzoriek s obsahom zeleru viac ako 1 %.

Lepšie výsledky sme dosiahli pri použití farbiva EvaGreen[®] Real-time PCR, kedy zistený detekčný limit bol 0,1 %. Po ukončení PCR sa vykonala analýza amplifikovaných fragmentov DNA zeleru na základe stanovenia závislosti fluorescence od teploty (melting curve analysis). Teplota topenia fragmentov DNA zeleru dosiahla hodnotu 78,88 °C. Determinačný koeficient s hodnotou 0,914 je vysoký, z čoho vyplýva, že regresná rovnica je vhodná na predpovedanie hodnoty koncentrácie zeleru v neznámej vzorke s percentom pravdepodobnosti 95,6 %.

Získané údaje teplôt topenia fragmentov DNA zeleru z PCR reakcie s využitím rôznych interkalačných farbív EvaGreen[®] Real-Time PCR a SYBRGreen[®] Real-Time PCR sme následne využili na detekciu zeleru v koreninách. Overili sme obsah zeleru vo vzorkách korenín pochádzajúcich z domácej produkcie a najmä z tretích krajín. Teploty topenia vzoriek korenín nepreukázali hodnoty zistené u zeleru metódou SYBRGreen[®] Real-TimePCR, pri ktorej bola teplota topenia 81,45 °C a metódou EvaGreen[®] Real-Time PCR, kde teplota topenia bola pri zeleri 78,88 °C. V oboch prípadoch sa nám zobrazili píky nešpecifické pre zeler. Zistené hodnoty môžu byť charakteristické pre príbuzné druhy korenín v rámci čeľade mrkvovité (*Apiaceae*). Žiadna vzorka z celkového počtu 15 analyzovaných vzoriek korenín nebola pozitívna na obsah zeleru.

V predmetnej práci sme prezentovali konkrétnu metodiku využitia klasickej PCR a real-time PCR vhodnú na detekciu zeleru ako alergénu v potravinách a využiteľnú pre prax v podnikových laboratóriách potravinárskeho priemyslu. Vzhľadom na fakt, že prahová hodnota pre spustenie alergickej reakcie po požití zeleru je 0,7 g a nie je legislatívne stanovený limit, nami prezentované metodiky sú vhodné na zisťovanie obsahu zeleru v potravinách.

Zoznam použitej literatúry

1. **BABIČKA, E. - KOCÚRKOVÁ, J. - BENEŠ, P. 2004.** Alergie z potravín: víme, čo môžeme jíst ? In *Moderní obchod*, roč. 19, 2004, č. 1, s. 26-27.
2. **BALMER - WEBER, BK. - VIETHS, S. - LUTTKOPF, D.- HEUSCHMANN, P. -WUTHRICH, B. 2000.** In *J Allergy Clin Immunol* 106:373-378.
3. **BERTO VÁ, L. – HLAVAČEK, A. – HOLUB, J. - JASIČOVÁ M. - ŠOURKOVÁ, M. - ZAHRADNÍKOVÁ, K. 1984.** *Flóra Slovenska IV/1.*, 1984, VEDA, vydavateľstvo SAV, 315 s.
4. **BJORKSTÉN, B. 2001.** The Epidemiology of food Allergy. Current opinion in Allergy and Clin. Immunology, 2001, 1,3, s. 225 – 227.
5. **BOUSQUET, J. – BJÔRKSTÉN, B. - BRUIJZEEL – KOOMEN CAFM. 1998.** Scientific criteria and the selection of allergenic foods for food labelling. In *Allergy*, 1998, s. 3 - 21.
6. **BREITENEDER, H. - EBNER, C. 2001.** Atopic allergens of plant foods. In *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 1, 3, s. 261 - 267.
7. **BUC, M. 2005.** *Autoimunita a autoimunitné choroby.* VEDA vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 2005, s. 14 – 206, ISBN 80-22408-67-0.
8. **COCA, F. A. 2001.** Pulzní diagnostika. Praha: Pragma. 2001, 151 s. ISBN 80-7205-819-3.
9. **DOVIČOVIČOVÁ, L. – OLEXOVÁ, L. – PANGALLO, D. – SIEKEL, P. 2004.** Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of celery (*Apium graveolens*) in food. In *Eur Food Res Technol*, vol. 218, 2004, s. 493 - 495.
10. **DREBORG, S. 1989.** Skin tests used in type I allergy testing. Position Paper, In *Allergy*, 44, 1989, Suppl. 10, s. 1 – 59.
11. **DREBORG, S. - NIGGEMANN, B. 1995.** In vivo testing for allergy. In *Basomba, J., Sastre, J.(Ed), Postgraduate Courses and Practical Workshops, Syllabus, ECACI 1995*, s. 187 - 192.
12. **ETTLEROVÁ K.** Zkřížená alergie, Ambulancia alergologie a klinickéj imunologie, Hradec Králové, <http://www.alergie.cz/getattachment/efff18d0-d97c-498c-9155-60aa4160ff4a/Skrizena-alergia.aspx>.

13. FERENČÍK, M. - ROVENSKÝ, J. - SHOENFELD, Y. - MAŤHA, V. 2004. *Imunitný systém – dobrý obranca, ale aj možný diverzant*. Slovak Academic Press, s.r.o., 1. vydanie, 2004, s. 169 – 181, ISBN 80-8910-445-2.
14. FERENČÍK, M. - MAŤHA, V. - ROVENSKÝ, J. - JENSEN- JAROLIM, E. 2006. *Imunológia a alergológia v základných heslách a termínoch*. Bratislava: Slovak Academic Press. 2006, 425 s. ISBN 80-89104-82-7.
15. GAMLIN, L. - BROSTOFF, J. 2003. *Alergia od A po Z*, s. 11, s. 58 – 64, ISBN 80-8898-315-0.
16. HELM, R. M., 2001. Food allergy: in vivo – diagnostic including challenge. In *Current opinion in Allergy and Clin. Immunology*, 2001, 1, s. 255 - 259.
17. HRUBIŠKO, M. - BARTA, T. - ČERVENKOVÁ, D. – ČIŽNÁR, P. – HRUŠKOVIČ, B. - CHOVAN, L. - KAYSEROVÁ, H. - KERTYS, P. – LUKÁN, N. - PAULOVIČOVÁ, E. - POTOCKÝ, M. 2003. *Alergológia*. Vydavateľstvo Osveta, 519 s, ISBN 80-8063 -110-7.
18. http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/foodlabelling/comm_legisl_en.htm.
19. http://foodallergens.ifr.ac.uk/food.lasso?selected_food=18#summary.
20. <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92106>.
21. <http://www.alergie.cz/bila-kniha>.
22. <http://www.alergie.cz/Bila-kniha/Epidemiologie-a-kriteria/Potravinova-alergie.aspx>.
23. <http://www.alergie.cz/Bila-kniha/Epidemiologie-a-kriteria/Geneticka-hlediska.aspx>.
24. <http://www.alergie.cz/Bila-kniha/Uvod.aspx>.
25. <http://www.alergie.cz/Uvodni-stranka/Institut-UCB.aspx>.
26. <http://www.alergie.cz/kontaktni-alergicka-dermatitida>.
27. <http://www.allallergy.net/fapaidfind.cfm?cdeoc=272>.
28. <http://www.bez-alergie.cz/aktualne/alergie-na-jahody-a-jine-ovoce-122>.
29. http://www.biotium.com/product/product_info/Newproduct/EvaGreen.asp.
30. <http://www.codexalimentarius.net>; Codex STAN 1-1985. Labelling of Prepackaged Food, General Standard for the labelling of prepackaged foods.
31. http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/foodlabelling/publications/labelling_citizens_summary_310108_final_cab_sk.pdf.
32. http://www.efsa.eu.in/science/nda/nda_opinions_catindex_en.html.

33. <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm089307.htm>.
34. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/04/sep04/091704/04N-0230-emc00010-01.pdf>.
35. <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM170952.pdf>
36. <http://www.drugs.com/npp/celery.html>.
37. http://www.ehow.com/about_5052616_celery-allergy-symptoms.html.
38. http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/foodlabelling/publications/sum_ia_general_food_labelling.pdf.
39. <http://foodallergens.ifr.ac.uk/ingredients.html>.
40. http://foodallergens.ifr.ac.uk/food.lasso?selected_food=18#summary.
41. <http://www.liecive.herba.sk/index.php/rok-2010/95-32010/992-sucasny-zivotny-styl-je-pre-alergie-ako-stvoreny-html>.
42. <http://www.ucb.com/about-ucb/history>.
43. <http://www.slv.se/upload/dokument/risker/allergi/K2Celery.pdf>, EFSA Journal (2004) 32, s.113 -119.
44. **HAVLÍČEKOVÁ, Z. - JESEŇÁK, M. - JAKUŠOVÁ, Ľ. - SZÉPEOVÁ, R. - BÁNOVČIN, P. (2008)**. Diéta v liečbe atopického ekzému v detskom veku. In *Dermatol.prax*, 2008, 4, s. 173-176.
45. **HUPFER, CH. - WAIBLINGER, H. U. - BUSCH, U. 2006**. Development and validation of a real-time PCR detection method for celery in food. In *Eur Food Res Technol* (2007) 225, s. 329-335.
46. **CHOVANCOVÁ, D. 1999**. Jarné trampoty. In: *Dieta nielen pre rodičov*, roč. 5, 1999, č. 3, s. 8-9.
47. **KAYSEROVÁ, H. 2004**. Potravinová alergia. In *VIA PRACTICA* 2, 2004, s. 90 – 94, http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=1717.
48. **KAYSEROVÁ, H. 1999**. Provokatéri na tanieri. In: *Zdravie*, roč. 55, 1999, č. 4, s. 10 -12.
49. **KAYSEROVÁ, H. 2000**. Potravinová alergia. In: *Alergo*, roč. 1, 2000, č.1, s. 16-17.
50. **KRAJČÍROVÁ, M. 2007**. Celiakálna choroba v primárnej starostlivosti. In *Pediatr. prax*, 2007; 5: s. 268 - 269.

51. **KUCHTA, T. 2005a.** Polymerázová reťazová reakcia ako metóda na analýzu potravín. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, roč. 44, 2005, č. 1-2, s. 1-16.
52. **KUCHTA, T. 2005b.** Identifikácia zložiek rastlinného a živočíšneho pôvodu v potravinách metódami využívajúcimi polymerázovú reťazovú reakciu. In *Bulletin potravinárskeho výskumu*, roč. 44, 2005, č. 3-4, s. 141-155.
53. **KVASNIČKOVÁ, A. 1998.** *Alergie z potravín*. Praha : ÚZPI 1998, 60 s. ISBN 80-85120-93-3.
54. **KVASNIČKOVÁ, A. - PIVOŇKA, J. - VOLDŘICH, M. 2005.** Alergeny v potravinách. In *Kvalita potravín*, roč. 5, 2005, č. 3, s. 30 - 33.
55. **MARTINOVSKÝ, J. – ČERVENKA, M. - PŘIKRYL, J. – PACHOLÍK, R. 1987.** *Kľúč na určovanie rastlín*. 4. vydanie, 1987, Slovenské pedagogické nakladateľstvo, s. 362 - 594.
56. **MICHALÍK, I. - BAUEROVÁ, M. 2001.** Celiakálne ochorenie známe i neznáme. In *Výživa a zdravie*, roč. 46, 2001, č. 1, s. 10 – 12.
57. **MOLKHOU, P. 2000.** Present and future problems. In *Food allergies*. The UCB Institute of Allergy, 2000, 107 s.
58. **MURRAY, EB. 1988.** The Acceptability of Milk and Milk Products in Populations with a High Prevalence of Lactose Intolerance. In *Am. J. Clin. Nutr.*, 1988, 48, s. 1080–1159.
59. **MURRAY, J. A. 1999.** The widening spectrum of coeliac disease. In *Am J. Clinical Nutrition*, 69, 1999, s. 354 – 365.
60. **NARIADENIE (ES) č.178/2002 Európskeho Parlamentu a Rady, ktorým sa ustanovujú všeobecné zásady a požiadavky potravinového práva, zriaďuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín a stanovujú postupy v záležitostiach bezpečnosti potravín**, 28. február 2002, Úradný vestník Európskych Spoločenstiev, L 31/1, 15/zv.6, s. 463 – 484.
61. **NARIADENIE (ES) č.1829/2003 Európskeho Parlamentu a Rady o geneticky modifikovaných potravinách a krmivách**, 22. september 2003, Úradný vestník Európskych Spoločenstiev, L 268, 18.10.2003. s. 1.
62. **NIGGEMANN, B. – REIBEL, S. - ROEHR, C.C. 2001.** Predictors of positive food challenge outcome in non – IgE - mediated reactions to food in children with atopic dermatitis. In *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, 108, 6, s. 1053 – 1057.

63. **NOUZA, K. 1981.** *Skrytá moc imunity*. Mladá fronta, 1981, s. 226. ISBN 23-109-81.
64. **NYULASSY, Š. 2003.** *Základy klinickej imunológie a alergiológie, časť I.*, Vysokoškolské učebné texty, Jeseniová Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Martine, 20. publikácia, HERBA, s.r.o., 2003, s. 7 – 13. ISBN 80-967994-9-5.
65. **Pracovný dokument útvarov Komisie k návrhu Nariadenia Európskeho Parlamentu a Rady o poskytovaní informácií o potravinách spotrebiteľom**, Brusel, SEK (2008) 95, KOM (2008) 40 v konečnom znení, Brusel, 30.1.2008, 89s.
66. **Pracovný dokument útvarov Komisie k návrhu Nariadenia Európskeho parlamentu a Rady o poskytovaní informácií o potravinách spotrebiteľom, Súhrnná správa o hodnotení vplyvu, pokiaľ ide o otázky všeobecného označovania potravín**, Brusel, SEK (2008) 95, 9 s.
67. **PRUŽINEC, P. 2002.** *Moja alergia*. Bonus, 2002, 148 s, ISBN 80-968-4913-1.
68. **RIMÁROVÁ, K. - LOVAYOVÁ, V. 2007.** Alergény a lepok v potravinách, prístupy k ich detekcii a označovaniu v EÚ. In *HYGIENA ALIMENTORUM XXVIII „Bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych výrobkov“*. Slovakia : Štrbské Pleso – Vysoké Tatry, 2007, s. 165-169. ISBN 978-80-8077-055-6.
69. **ROBINSON, F. 2002.** Food Allergy, British Nutrition Foudation, UK, *Potravinová alergia*, vydal Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, 2002, s. 11.
70. **RUJNER, J. - CICHANSKA, B. A. 2006.** *Bezlepková a bezmliečna diéta*. Brno: Computer Press. 2006, 108 s. ISBN 80-251-0775-2.
71. **SABOLOVÁ, G. 2004.** Ochrana osôb trpiacich potravinovou alergiou v Európskej potravinovej legislatíve. In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 29, 2004, č. 4, s. 12-13.
72. **SAMPSON, H. A. - MENDELSON, L. - ROSEN, J. P. 1992.** Fatal and near fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. In *A. Engl. J. Med.*, 327, 1992, s. 380-384.
73. **SAMPSON, H. A. – METCALFE, D. D. 1993.** Potravinová alergie. In: *Jama*, roč. 1, 1993, č. 3, s. 203-207.
74. **SAMPSON, H. A. 2001.** Food Allergy: imunology of the GI mucosa towards classification and understanding of GI hypersensitivities. In *Pediatr Allergy Immunol.*, 2001,12, Suppl.14, s. 7 – 9.

75. **SANDBERG, M. - LUNDBERG, L. - HAUGLAND MOEN, L. - MALMHEDEN YMAN, I. 2009.** *Detection of celery (Apium graveolens) in food*, National Food Administration, Uppsala Sweden, National veterinary Institute, Oslo, Norway.
76. **SEDLÁK, E. – DANKO – VARHAČ – PAULÍKOVÁ - PODHRADSKÝ, 2007.** *Praktikum z biochémie*. Univerzita P. J. Šafárika, Košice. 2 vydanie. 129 s.
77. **SHUNGU, L. - RUIBAO, Z. - SHAOJUN, T. 2007.** A Study on Subunit Groups of Soybean Protein Extracts under SDS-PAGE. In *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 2007, s. 793-801.
78. **SICHERER, S.H. - MUNOZ - FURLONG, A. – SAMPSON, H. A. 2004.** Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 114: s. 159 - 165.
79. **SICHERER, S. H. – MUNOZ – FURLONG, A. – SAMPSON, H. A. 2003.** Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: A 5 – year follow-up study. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 112: s. 1203-1207.
80. **Smernica 2000/13/ES Európskeho parlamentu a Rady o aproximácii právnych predpisov členských štátov, týkajúcich sa označovania, prezentácie a reklamy potravín**, 20.3.2000, Úradný vestník Európskych Spoločenstiev, L 109/29, 15/zv.5, vydané 6.5.2000, s. 75 – 89.
81. **Smernica Európskeho Parlamentu a Rady 2003/89/ES, ktorou sa mení a dopĺňa smernica 2000/13/ES o označovaní zložiek prítomných v potravinách**, 10.11.2003, Úradný vestník Európskych Spoločenstiev, L 308, vydané 25.11.2003, s. 15 – 18.
82. **Smernica Komisie 2005/26/ES, ktorou sa ustanovuje zoznam zložiek potravín alebo látok dočasne vylúčených z prílohy IIIa k smernici 2000/13/ES**, 21.3.2005, Úradný vestník Európskej únie, L 75, s. 33 – 34.
83. **ŠIMONČIČ, R. 1997.** Neznášanlivosť niektorých potravín. In *Výživa a zdravie*, roč. 42, 1997, č. 2, s. 25-26.
84. **ŠPIČÁK, V. - HRUBIŠKO, M. 2005.** Alergia čím viac o nej budete vedieť, tým menej Vás bude trápiť. UCB Inštitút pre alergiu, Bratislava, 2005, s. 5 - 11.

85. ŠTEFANOVIČ, J. 2004. Možnosti identifikácie alergie a intolerancie po konzumácii geneticky modifikovaných potravín. In *Biologická bezpečnosť a agropotravinárstvo: Zborník referátov z celoštátneho odborného seminára cyklu Biologická bezpečnosť*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2004, s. 80-88, ISBN 80-8069-336-6.
86. **Vedecký názor panelu na dietetické produkty, výživu a alergie na požiadanie Komisie, týkajúci sa hodnotenia alergických potravín pre účely označovania** (Opinion of the EFSA Scientific Panel on Dietetic Products, nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes (request N° EFSA-Q-2003-016, In *The EFSA Journal* (2004) 32, 197 s.
87. WAL, J. M. 1998. Immunochemical and molecular characterisation of milk allergens. In *Allergy*, 1998, 53, Suppl. 46, s. 114 – 117.
88. WOODS, R. K. - THIEN, F. - RAVEN, J. - WALTERS, E. H. - ABRAMSON, M. 2002. Prevalence of food allergies in young adults and their relationship to asthma, nasal allergies and eczema. In *Annals of Allergy Asthma & Immunology*, 88, 2002, s. 183-189.
89. WU, Y. - CHEN, Y. - WANG, B. – GAO, Y. - LIQUN, B. - WANG, H. 2010. SYBR Green Real-time PCR used to detect celery in food. In *Journal of AOAC International*, 93, 5, s. 1530-1533.
90. XI, M. - PENG, S. - PINGLI, H. 2010. Development of monoclonal antibodies and competitive ELISA detection method for glycinin an allergen in soybean. In *Food Chemistry*, 121, 2010, s. 546-551.
91. YOUNG, E. – STONEHAM, MD. - PETRUCKEVITCH, A. – BARTON, J. - RONA, R. 1994. *A population study of food intolerance*. *Lancet* 343 (8906), s. 1127 – 1130.