

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

Možnosti analýzy potravinových alergenů

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Soňa Vrabčková**
Osobní číslo: **C17260**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Možnosti analýzy potravních alergenů**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. V první části bakalářské práce popište, co to jsou potravní alergie a jaké jsou nejčastější alergeny. Popište příznaky alergických reakcí. V další části se zaměřte na možnosti detekce a analýzy potravních alergenů, kvalitativní i kvantitativní. Pro vypracování rešerše využijte dostupnou odbornou literaturu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Odborná literatura týkající se dané problematiky, z většiny ne starší než 7 let.
Vědecké články dostupné v databázích Scopus, Web of science, PubMed,
Sciencedirect.**

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

5. února 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. července 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prehlasujem:

Túto prácu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, najmä so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy o použití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tým, že pokiaľ dôjde k použitiu tejto práce mnou alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernicou Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práca zverejnená v Univerzitnej knižnici a prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa 03.07.2019

Soňa Vrabčková

Pod'akovanie:

Ďakujem pani RNDr. Koreckej Lucii, Ph.D. za jej odborné vedenie, cenné rady a pripomienky, ktoré mi poskytla pri vypracovaní bakalárskej práce.

ANOTÁCIA

Táto bakalárska práca je zameraná na potravinové alergény a možnosti ich detekcie. V prvej časti práce sú uvedené základné charakteristiky o tom, čo je to alergia, príznaky potravinovej alergie a najčastejšie alergény podliehajúce legislatíve, ktoré sa vyskytujú v potrave. Druhá časť práce je venovaná diagnostike a samotnej detekcii potravinových alergénov.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

alergia, potravinové alergény, príznaky alergických reakcií, diagnostika, detekcia alergénov

TITLE

Possibilities of food allergens analysis

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on allergens and possibilities of their detection. The basic characteristics of allergy, the symptoms of food allergy and the food allergens are described in the first part of this thesis. The second part is devoted to diagnostics and detection of food allergens.

KEYWORDS

allergy, food allergens, allergic reactions, diagnostics, detection of allergens

OBSAH

ÚVOD.....	11
1. ALERGIA	12
1.1. POTRAVINOVÁ ALERGIA	13
1.2. POTRAVINOVÁ ALERGICKÁ REAKCIA	13
1.2.1. Alergická senzibilizácia	13
1.2.2. Alergén	14
1.2.3. Skřížená reaktivita.....	14
1.3. POTRAVINOVÉ ALERGÉNY	15
1.4. PREJAVY POTRAVINOVEJ ALERGIE	16
1.5. POTRAVINOVÁ NEZNÁŠANLIVOSŤ	17
1.6. ANAFYLAXIA	17
1.7. HLAVNÉ POTRAVINOVÉ ALERGÉNY	18
1.7.1. Obilniny obsahujúce lepok.....	18
1.7.2. Kôrovce a výrobky z nich	18
1.7.3. Mäkkýše a výrobky z nich.....	19
1.7.4. Vajcia a výrobky z nich.....	21
1.7.5. Ryby a výrobky z nich.....	22
1.7.6. Podzemnica olejná (arašidy) a výrobky z nej.....	22
1.7.7. Sójové zrná a výrobky z nich	23
1.7.8. Mlieko a výrobky z neho.....	24
1.7.9. Orechy	25
1.7.10. Zeler a výrobky z neho.....	26
1.7.11. Horčica a výrobky z nej	27
1.7.12. Sezamové semená a výrobky z nich	27
1.7.13. Oxid siričitý a siričitany	28
1.7.14. Vlčí bôb a výrobky z neho	29
2. MOŽNOSTI DETEKcie POTRAVINOVÝCH ALERGÉNOV	30
2.1. DIAGNOSTICKÉ TESTY POTRAVINOVEJ ALERGIE.....	30
2.1.1. Kožné prick testy.....	30
2.1.2. Stanovenie špecifického IgE (sIgE)	31
2.1.3. Kožné náplast'ové testy	32
2.1.4. Expozičné testy	33
2.2. KVANTITATÍVNE A KVALITATÍVNE METÓDY STANOVENIA POTRAVINOVÝCH ALERGÉNOV.....	34
2.2.1. ELISA.....	34
2.2.2. Metódy na báze DNA.....	35
2.2.3. BIOSENZORY	37
2.2.4. POVRCHOVÁ PLAZMÓNÓVÁ REZONANCIA (SPR)	39
2.2.5. POC technológia	41
2.2.6. HPLC-MS/MS.....	42
2.2.7. Hmotnostná spektrometria- MS	44
3. ZÁVER.....	46
4. BIBLIOGRAFIA	47

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Najznámejšie skrížené reaktivity	15
Tabuľka 2: Bežné alergény článkonožcov	20
Tabuľka 3: Proteínové zloženie albumínu	21
Tabuľka 4: Alergény arašidov	23
Tabuľka 5: Alergény sóji	24
Tabuľka 6: Alergény kravského mlieka	25
Tabuľka 7: Alergény orechov	26
Tabuľka 8: Alergény zeleru	26
Tabuľka 9: Alergény horčice	27
Tabuľka 10: Alergény sezamových semien	28
Tabuľka 11: Najbežnejšie zdroje siričitanov	28
Tabuľka 12: Hladiny „cut-off“ sIgE vzťahnuté k PPV	32
Tabuľka 13: Porovnanie senzitivity a špecificity rôznych testov	33
Tabuľka 14: Typy, zloženie a výhody SPR biosenzorov	40

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Schematické znázornenie imunopatologickej reakcie I. typu s degranuláciou buniek.....	12
Obrázok 2: Alergická senzibilizácia: mechanizmus primárnej senzibilizácie a sekundárnej odpovede	14
Obrázok 3: Symboly jednotlivých alergénov daných smernicou 1169/2011 EÚ	16
Obrázok 4: Klasifikácia nepriaznivých reakcií na potraviny	17
Obrázok 5: Kožné prick testy s výsledným pupencom	31
Obrázok 6: Možnosti usporiadania ELISA	34
Obrázok 7: ELISA založená na rekombinantných IgE protilátkach voči β -laktoglobulínu	35
Obrázok 8: Výsledné amplifikačné krivky systému Hom (<i>Homarus sp.</i>) v LOD ₁₀ stanovení	36
Obrázok 9: Detekcia alergénov pomocou biosenzorov	38
Obrázok 10: Schéma sendvičovej imunosenzibilizačnej platformy	39
Obrázok 11: Znázornenie kvantitatívnych platforiem založených na SPR biosenzore.....	41
Obrázok 12: POC biosenzor na báze Smartphone.....	42
Obrázok 13: Monitorovanie režimu viacerých reakcií siedmich alergénnych potravín.....	43
Obrázok 14: UPLC-MS/MS chromatogram cieľových peptidov	44

ZOZNAM SKRATIEK

APT	kožný náplast'ový test (atopy patch test)
CR	skrížená reaktivita (cross reactivity)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAST	enzýmový test alergénu na pevnej fáze (enzyme allergeo-sorbent test)
ELISA	enzýmová imunoanalýza na pevnej fáze (enzyme linked immunosorbent assay)
ESI-IT	ionizácia elektrosprejom v kombinácii s iónovou pascou (electrospray ionization-ion trap)
ESI-qTOF	ionizácia elektrosprejom v kombinácii s kvadrupólovým detektorom doby letu (electrospray ionization-quadrupole time of flight)
EFSA	Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (European food safety authority)
FEIA	enzýmová imunoanalýza s fluorescenčnou detekciou (fluorescent enzyme immunoassay)
FPIES	syndróm enterokolitídy navodený potravinovými proteínmi (food protein-induced enterocolitis syndrome)
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (high-performance liquid chromatography)
HPLC-MS/MS	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia spojená s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry)
IgE	imunoglobulín E
LOD	limit detekcie (limit of detection)
MALDI-TOF	ionizácia laserom za prítomnosti matrice v kombinácii s detektorom doby letu (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight)
MS	hmotnostná spektrometria (mass spectrometry)
OAS	orálny alergický syndróm (oral allergy syndrome)
PA	potravinová alergia
PCR	polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction)
PFS	peľovo-potravinový syndróm (pollen-food syndrome)

PHMN-Trypsín	trypsín imobilizovaný na vlasatých hybridných magnetických nanočasticach (trypsin immobilized on hairy polymer-chain hybrid magnetic nanoparticles)
RAST	rádiový test alergénu na pevnej fáze (radioallergosorbent test)
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina
RT-PCR	polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (real-time polymerase chain reaction)
sIgE	špecifický imunoglobulín E
SPT	kožný prick test (skin prick test)
SPR	povrchová plazmónová rezonancia (surface plasmon resonance)
UPLC-MS/MS	ultra-vysokovýkonná kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry)
UV	ultrafialové žiarenie

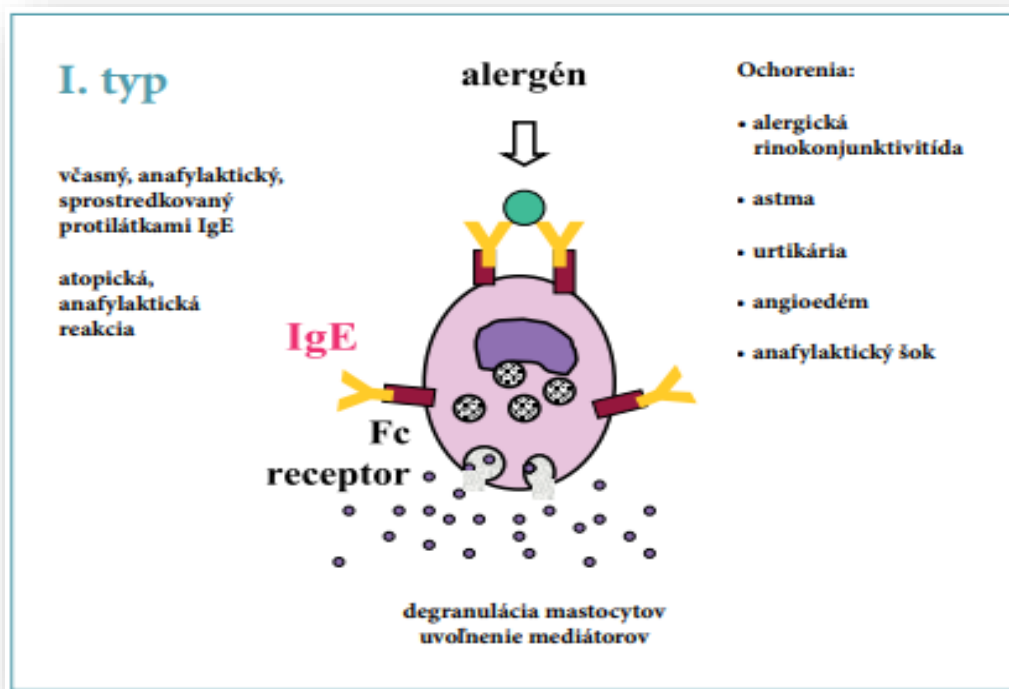
ÚVOD

Súčasná doba ponúka potraviny, ktoré po minulé storočia existovali len v určitých zemepisných šírkach a človek o nich mal len skreslené predstavy. Dnes už je dovoz potravín z iných zemí bežná záležitosť. S pribúdajúcimi potravinami na trhu rastie aj riziko potravinovej alergie. Európsky úrad pre bezpečnosť potravín zostavil zoznam štrnástich potravín, ktoré predstavujú hlavné potravinové alergény. Jedná sa o obilniny obsahujúce lepok, kôrovce, vajcia, ryby, arašidy, sóju, mlieko, orechy, zeler, horčicu, sezam, oxid siričitý a siričitany, vľčí bôb a mäkkýše a ich jednotlivé alergény sú popísané v tejto bakalárskej práci. Potravinová alergia je sprostredkovaná IgE protilátkami a z globálneho hľadiska postihuje najmä deti. Prejavuje sa svrbením a začervenaním kože, ekzémom, ďalej bolesťami v bruchu, zvracaním a v neposlednom rade môže ohroziť život rozvojom anafylaktického šoku. Jedinou odporúčanou liečbou je prísne dodržiavanie diéty a eliminácia alergénu zo stravy. Pri samotnej diagnostike potravinovej alergie sa používajú kožné prick testy, náplast'ové testy a expozičné testy, pri ktorých zistíme, či nejakú alergiu vôbec máme.

Alergény dokážu už v malých množstvách vyvolať alergickú reakciu, preto je dôležité vyvíjať nové, citlivé a spoľahlivé metódy, ktoré dokážu určiť jednotlivé alergény v potravinách kvalitatívne, ale aj kvantitatívne, a to v čo najnižšej koncentrácii, pretože aj stopy alergénu môžu u citlivého jedinca viesť k rozvoju alergickej reakcie. Táto bakalárska práca sa zaoberá aj metódami, ktoré sa pre stanovenie alergénu využívajú, a to od najbežnejších kvantitatívnych metód ako je ELISA a metódy na báze DNA, cez biosenzory či povrchovú plazmónovú rezonanciu, až po vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu spojenú s metódou tandemovej hmotnostnej spektrometrie, ale aj hmotnostnou spektrometriou, ktorá je vhodnejšia pre výskumné účely.

1. ALERGIA

Alergia je reakcia precitlivenosti, iným slovom hypersenzitivity, a je navodená imunologickými mechanizmami. Môže byť sprostredkovaná protilátkami IgE, nesprostredkovaná protilátkami IgE a sprostredkovaná bunkami [1]. Alergia je definovaná ako porucha imunity. Predstavuje obrannú reakciu organizmu na látky, ktoré sú často neškodné a s ktorými zdravý človek nemá žiadne problémy. Alergia je sprostredkovaná imunopatologickou reakciou I. typu (atopická, hypersenzitívna reakcia sprostredkovaná IgE protilátkami, vid' obr. 1). Po kontakte alergénu s organizmom dochádza k transportu alergénu cez sliznicu. Postihnutý s alergiou má v tele IgE protilátky, ktoré bojujú proti danému alergénu. Po spojení dvoch IgE molekúl, ktoré sú viazané na bazofily alebo mastocyty sa spustí kaskáda reakcií. Najdôležitejším pochodom je degranulácia buniek, pri ktorej dochádza k uvoľneniu mediátora histamínu do organizmu. Jeho pôsobením dochádza k opuchom, kontrakcii svalov a iným príznakom, ktoré sú základnými prejavmi klinickej alergie [2].



Obrázok 1: Schematické znázornenie imunopatologickej reakcie I. typu s degranuláciou buniek, prevzaté z: [2]

1.1. Potravinová alergia

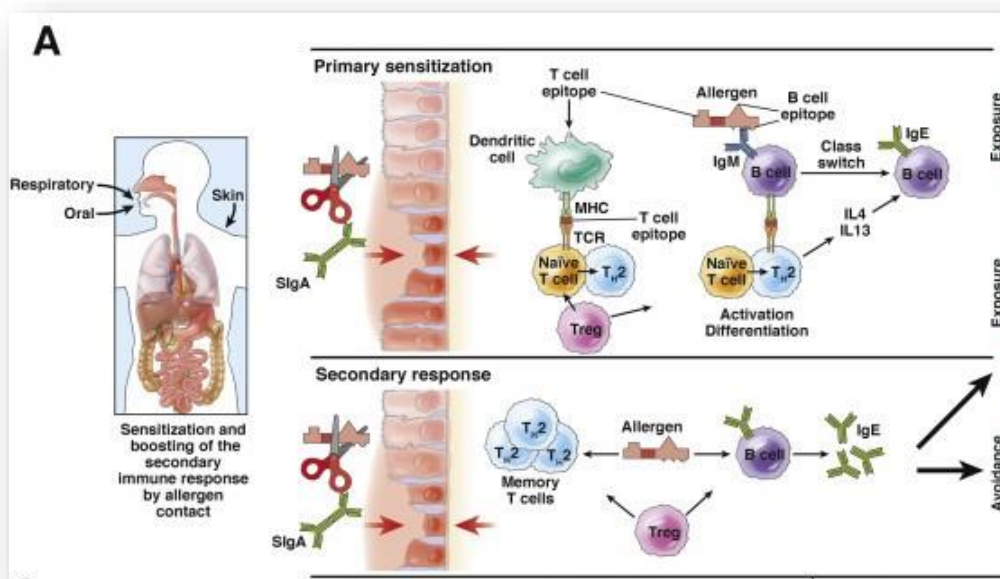
Potravinová alergia (PA) je definovaná ako imunologická reakcia vyvolaná konzumáciou alebo iným kontaktom s danou potravinou. Z klinického hľadiska možno precitlivosť na potraviny klasifikovať ako potravinovú alergiu, ktorá zahŕňa imunitný systém a nealergickú precitlivosť ako potravinovú intoleranciu, ktorá zahŕňa metabolické poruchy, ako sú napríklad intolerancia laktózy. Potravinová intolerancia nie je na imunologickom základe [3].

1.2. Potravinová alergická reakcia

Alergická reakcia je imunologický mechanizmus, ktorý je indukovaný u senzibilizovaných jedincov po expozícii príslušným alergénom prítomným v potrave. Potravinová alergia sa vyvíja v dvoch fázach. V prvej fáze sú citliví jedinci imunologicky aktivovaní na špecifické potravinové proteíny, čo vedie k alergickej senzibilizácii. Dosiachnutie senzibilizácie nastáva po expozícii potravinovým proteínom v potrave alebo prostredníctvom iných ciest expozície (inhalácia, kontakt s pokožkou). Ak sa následne senzibilizovaní jedinci s dostatočnými hladinami indukujúceho alergénu (alergénov) v potrave stretnú, môže sa vyvolať alergická reakcia. Najbežnejším imunologickým mechanizmom, ktorý sa podieľa na senzibilizácii, je tvorba IgE protilátok. Avšak imunitné reakcie sprostredkované inými ako IgE protilátkami sú rovnako dôležité pri iných formách potravinovej alergie [4, 5].

1.2.1. Alergická senzibilizácia

Alergická senzibilizácia predstavuje prvú indukciu alergickej reakcie pri kontakte s alergénom. Poznáme dve cesty alergickej senzibilizácie (viď obr. 2). Orálne alergény (napr. mlieko, vajcia, arašidy) spôsobujú senzibilizáciu cez gastrointestinálny trakt. Aeroalergény (napr. peľ) spôsobujú senzibilizáciu prostredníctvom dýchacích ciest [6, 7].



Obrázok 2: Alergická senzibilizácia: mechanizmus primárnej senzibilizácie a sekundárnej odpovede, prevzaté z: [6]

1.2.2. Alergén

Spúšťač alergickej reakcie sa nazýva alergén. Alergény majú mnoho podôb a môžu sa vyskytovať vo všetkom, čo konzumujeme, dýchame alebo sa dotýkame. Keď sa alergén pripojí k receptoru na povrchu imunitnej bunky, spustí sa kaskáda reakcií a tým sa aktivuje zosilnená reakcia imunitného systému. Existujú alergény, ktoré vyvolávajú tak búrlivú odpoveď, že už pri nepatrnom množstve dokážu vyvolať anafylaktický šok [8]. Je to závažná alergická reakcia, pri ktorej sa okamžite alebo v priebehu niekoľkých minút po vystavení alergénu objavia typické symptómy (urtikária, angioedém, bolesť brucha). Reakcia postupuje rýchlo a postihuje viac orgánov [9].

1.2.3. Skrížená reaktivita

U niektorých antigénov môže dochádzať k tzv. skríženej reaktivite. Tá je prirodzeným imunologickým javom, ktorý vzniká na základe rovnakých povrchových štruktúr tzv. epitopov na rôznych antigénoch. Protilátky sa naviažu na konkrétnu oblasť antigénu, ktorý nevyvolal ich produkciu. Pokiaľ je daný antigén súčasne alergénom, dochádza k skríženej reakcii. V Tabuľke č. 1 sú uvedené najznámejšie vzťahy skríženej reaktivity. Skrížená reakcia je súčasťou mnohých alergií. Až u 70% jedincov postihnutých alergiou dochádza k rozvoju príznakov

alergickej reakcie na viac alergénov. Medzi najznámejšie patrí peľovo-potravinový syndróm (PFS) a orálny alergický syndróm (OAS) [10].

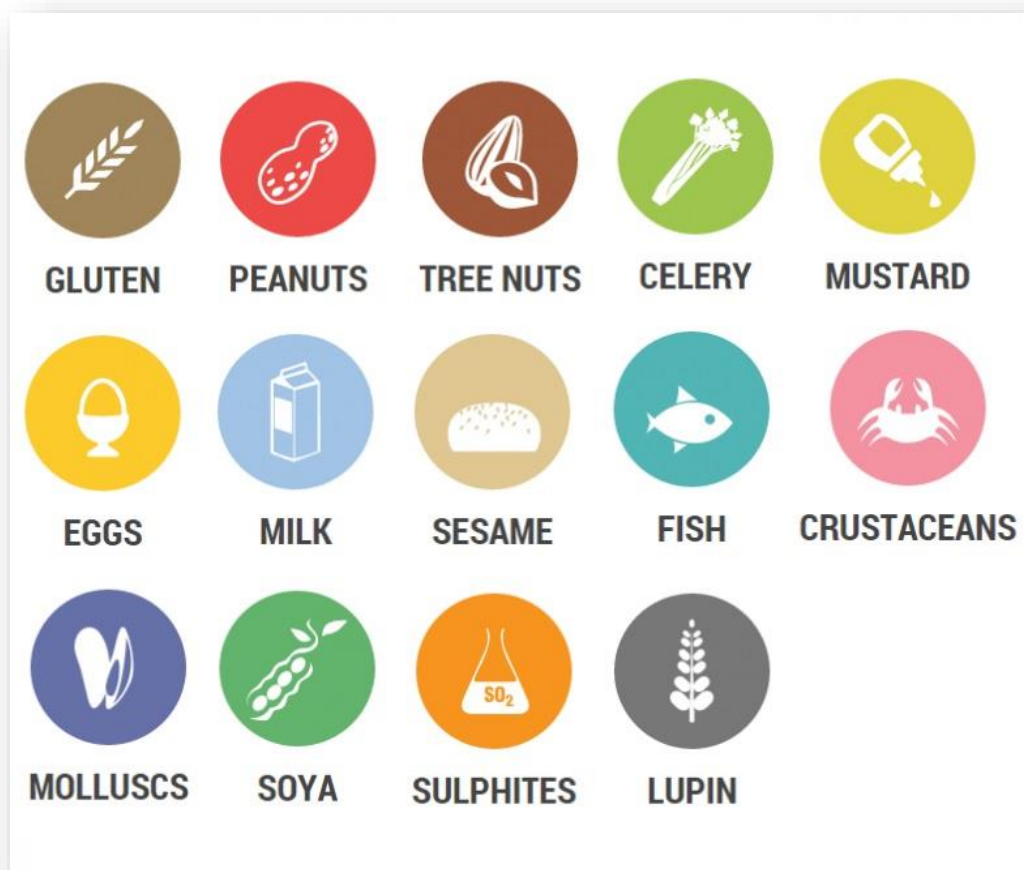
Tabuľka 1: Najznámejšie skrížené reaktivity [10]

Skrížená reaktivita vzdušných a potravinových alergénov	
Aeroalergény	Skrížená reaktivita-potraviny
Bežné	
peľ brezovitých stromov	jablko, lieskový oriešok, mrkva, čerešňa, broskyňa, marhuľa, kiwi, zeler, sója, figovník
Menej časté	
palina latex	korenie, mrkva, zeler, mango, slnečnica avokádo, banán, kiwi, jedlý gaštan, broskyňa, mango a papája
Vzácne	
figovník plačúci	figy (sušené), kiwi, banán, papája, ananás, avokádo a chlebovník
roztoče zvieracie alergény (mačka)	kôrovce a mäkkýše mäso (bravčové)
perie	vajcia, morka-mäso (aj vnútornosti)
Neisté	
ambrózia trávy	melóny, cuketa, uhorka, banán múky, otruby, paradajky, strukoviny

1.3. Potravinové alergény

Akákoľvek zložka potravy bielkovinového pôvodu môže byť potencionálne alergénna. Najčastejšie sa jedná o malé rozpustné glykoproteíny, teda proteíny obsahujúce v molekule zvyšky cukrov. Prevalencia potravinových alergénov a reakcií na ne je určená tradíciami, zaužívaným stravovaním, vekom, geografickou polohou a mnohými ďalšími faktormi. Až 90 % všetkých potravinových alergií však tvorí 8 základných druhov potravín (tzv. veľká osma). Patria sem: kravské mlieko, vajcia, pšenica, sója, arašidy, stromové orechy, ryby a mäkkýše [10, 11, 12].

Podľa nariadenia Európskeho parlamentu č. 1169/2011 bol zostavený na základe vedeckých stanovísk zoznam potravinových alergénov, ktoré prijal Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA). Na obr. 3 je uvedených 14 hlavných potravinových alergénov, ktoré podľa vyhlášky podliehajú legislatíve. Alergény musia byť označené [13].



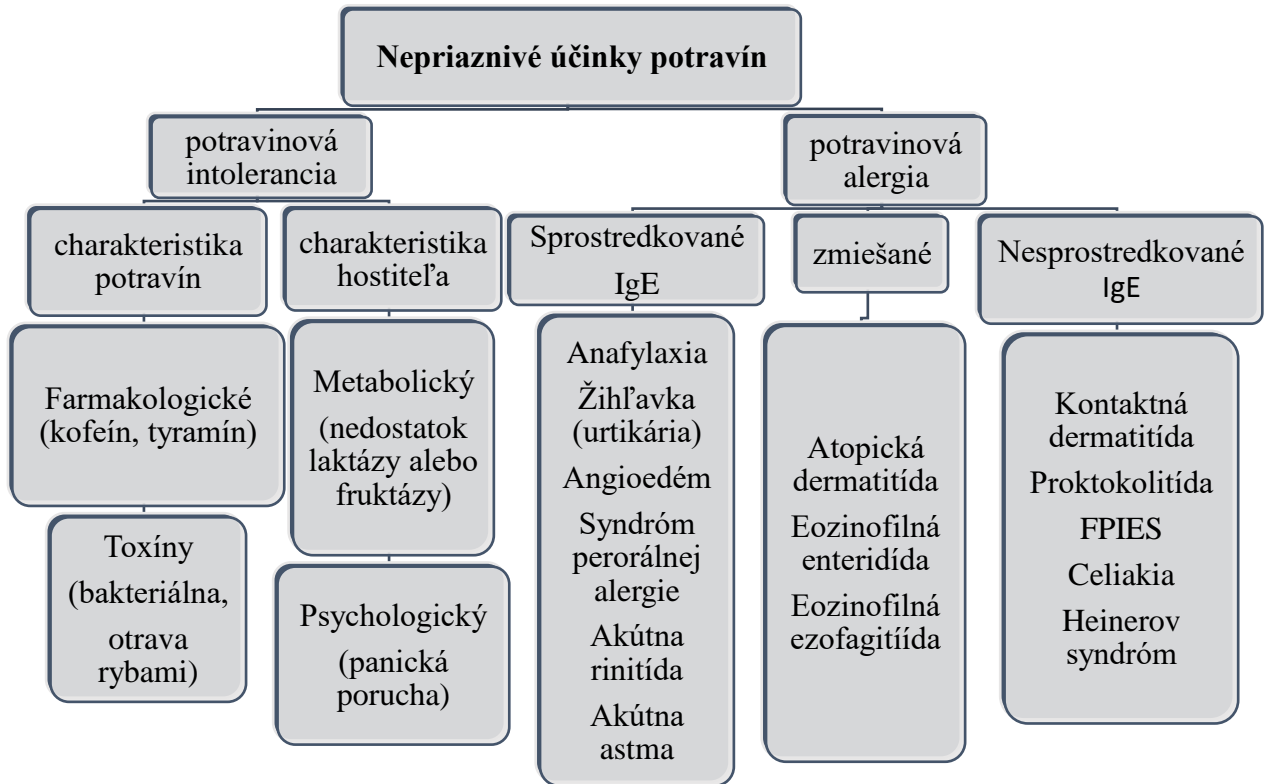
Obrázok 3: Symboly jednotlivých alergénov daných smernicou 1169/2011 EÚ [14]

1.4. Prejavy potravinovej alergie

Potravinová alergia sa až v 80 % postihnutých jedincov prejavuje na koži. Koža reaguje na potraviny buď včas (svrbenie, začervenanie, urtikária, angioedém), alebo sa alergia prejaví až v neskoršom štádiu, kedy už dochádza k chronickému ochoreniu ako je atopický ekzém alebo atopická dermatitída [10].

Druhým najčastejším príznakom sú poruchy gastrointestinálneho traktu. Konzumáciou potravy, na ktorú je človek alergický, vyvolá v čreve zápal, ktorý vedie k priepustnosti črevnej sliznice. S tým je spojená nevoľnosť, bolesť a kŕče v bruchu, migrény a zvracanie [8].

Alergia sa môže prejavovať aj v oblasti očí (začervenanie, precitlivosť očnej spojivky), dýchacích ciest (nádcha), alebo aj nervozitou, nespavosťou, trvalou únavou, čo súvisí s nervovým systémom. Stručný prehľad nepriaznivých účinkov potravín na človeka je znázornený na obr. 4 [15].



Obrázok 4: Klasifikácia nepriaznivých reakcií na potraviny [16]

1.5. Potravínová neznášanlivosť

Medzi nežiadúce reakcie na potraviny patrí aj potravínová neznášanlivosť. Jedná sa o nealergické reakcie na potraviny, ktoré nezahŕňajú imunitný systém. Neznášanlivosť ako je napríklad intolerancia laktózy, sa vyskytuje ako dôsledok nedostatku enzýmu, ktorý rozkladá laktózu. Potravínová intolerancia sa najviac prejavuje pri syndróme dráždivého čreva [17].

1.6. Anafylaxia

Najzávažnejšia alergická reakcia spôsobená rýchlym uvoľnením mediátora z mastocytov a bazofilov do krvného obehu je anafylaxia. Je sprevádzaná zvýšenou hladinou IgE protilátok, za predpokladu, že došlo k senzibilizácii organizmu alergénom. Potraviny sú primárny spúšťač anafylaxie [10].

Anafylaxia začína expozíciou alergénu, ktorý vytvára so špecifickým IgE v žírnych bunkách väzbu a táto väzba pomocou iónových kanálikov vedie k aktivácii a uvoľneniu histamínu, čo spôsobuje urtikáriu a angioedém. Prejavuje sa náhle intenzívnym svrbením už po niekoľkých sekundách, minútach alebo hodinách od zjedenia potravy. Reakcia sa prejavuje aj tráviacimi ťažkosťami, ako sú nevoľnosť, zvracanie a hnačka, ale aj dýchacími poruchami ako je kašeľ, kýchanie a edém hrtanu. Pokiaľ nie je okamžite podaný adrenalín, dochádza k anafylaktickému šoku, ktorý môže mať smrteľný koniec pre ľudský organizmus [18].

1.7.Hlavné potravinové alergény

1.7.1. Obilniny obsahujúce lepok

Jedným z najvýznamnejších alergénov je lepok spôsobujúci chorobu nazývanú celiakia, ktorá sa vyskytuje u 1-2% populácie, avšak jej prevalencia sa z roka na rok zvyšuje. Väčšina ľudí citlivých na lepok ani nevie, že danú chorobu majú [19]. Celiakia je bežná choroba vyvolaná imunitným systémom tenkého čreva, ktorá nastáva expozíciou gluténu u citlivých jedincov. Jediná odporúčaná liečba je celý život dodržiavať bezlepkovú diétu [20].

Medzi potraviny obsahujúce lepok patrí pšenica, raž, jačmeň, ovos, špalda, kamut alebo ich hybridné odrody a výrobky z nich. Pre svetovú populáciu je pšenica jedným z hlavných zdrojov živín. Spúšťačom sú proteíny pšenice vrátane gluténových a bezlepkových proteínov. Bielkovinový obsah pšenice tvorí hlavne lepok, nazývaný tiež aj glutén. Ten sa delí na gliadín a gluteín. Keď sa pšeničná múka zmieša s vodou, prítomné gliadíny zachovávajú cestu viskozitu a roztlačnosť, naopak gluteíny dodávajú cestu elasticitu [21].

Lepok sa bežne pridáva do cestovín, omáčok, pečiva, chlebov, čo spôsobuje prítomnosť škodlivejších druhov gluténu a zvýšenú konzumáciu spracovaných potravín, ktorá vedie k celiakii [19].

Alergia na lepok sa prejavuje bolesťami brucha, pálením záhy, atopickým ekzémom a v neposlednom rade aj anafylaxiou, ktorá je u dospelých vyvolaná fyzickou námahou [10].

1.7.2. Kôrovce a výrobky z nich

Ďalšou významnou skupinou sú kôrovce. Patria tu krevety, kraby, raky a homáre. Kôrovce sú dôležitou súčasťou ľudskej výživy a zohrávajú v nej významnú úlohu, avšak môžu byť aj príčinou závažnej akútnej reakcie z precitlivenosti [22].

Alergénosť potravín obsahujúcich kôrovce závisí od alergénov, ktoré sa musia identifikovať na rozpoznanie alergií, za ktoré sú zodpovedné. Sú to alergény, ktoré sa radia k svalovým proteínom, enzýmy a štruktúrne a cirkulujúce proteíny (viď Tabuľka č. 2). Medzi jednotlivými skupinami alergénov dochádza ku skríženej reakcii, čo môže byť prejavom skríženej alergie medzi roztočmi, kôrovcami, hmyzom a mäkkýšmi. U pacientov alergických na kôrovce môže konzumácia jedlého hmyzu vyvolať alergickú reakciu [23].

1.7.3. Mäkkýše a výrobky z nich

Potravinársky významnú skupinu tvoria aj mäkkýše. Významné sú ustrice, mušle, lastúry a slimáky. Alergia na morské plody sa prejavuje okamžite alebo do niekoľkých hodín a to respiračnými problémami alebo orálnym alergickým syndrómom. Morské plody sú najbežnejšie spúšťače anafylaktickej reakcie. Reakcia sa najčastejšie dostaví po zjedení, no v niektorých prípadoch stačí aj kontakt s pokožkou alebo inhalácia počas varenia, či spracovania. Až v 90% prípadoch alergia na morské plody pretrváva. Alergénne proteíny u mäkkýšov sú tropomyozín, paramyozín a arginínkináza. Medzi rybami, kôrovcami a mäkkýšmi dochádza k skríženej reaktivite. Tropomyozíny z mäkkýšov a rybie parvalbumíny patria k najviac študovaným alergénom morských plodov. V Tabuľke č. 2 sa nachádza prehľad alergénov známych článkonožcov [24].

Tabuľka 2: Bežné alergény článkonožcov [23]

Typ proteínov	Bielkoviny	Kódy alergénov	Výskyt
Svalový proteín	tropomyozín	Ale o 10, Blo t 10, Cho a 10, Der f 10, Der p 10, Lep d 10, Tyr p 10	roztoče
		Cha f 1, Cra c 1, Hom a 1, Lit v 1, Met e 1, Pan b 1, Pan s 1, Pero a 1, Pero i 1, Pero m 1, Por p 1, Pro c 1	kôrovce
		Aed at 10, Ano g 7, Bla g 7, Bomb m 7, na 7, Chi k 10, Copt f 7, Lep s 1	hmyz
		Ana br 1, Cra g 1, Hal l 1, Hel as 1, Mac r 1, Mel l 1, Bag g 1, Tod p 1 Ani s 3, Asc l 3	mäkkýše červy
	troponín C	Tyr p 34	roztoče
		Cra c 6, Hom a 6, Pen m 6, Pon l 7	kôrovce
		Bla g 6, na 6	hmyz
	myozín	Der f 26	roztoče
		Art en 5, Cra c 5, Hom a 3, Lit v 3, Pen m 3, Pro c 5	kôrovce
		Bla g 8	hmyz
enzýmy	alfa-amyláza	Blo t 4, Der f 4, Der p 4, Eur m 4	roztoče
		Bla g 11, Per 11, Sim vi 4	hmyz
	arginínkináza	Der f 20, Der p 20	roztoče
		Cra c 2, Litv 2, Pen m 2, Pro c 2, Scy p 2, Bla g 9, Bomb m 1, Per 9, Plo i 1	kôrovce hmyz
	chitinázy	Blok 15, Blo t 18, Der f 15, Der f 18, Der p 15, Der p 18	roztoče
		Per a 12	hmyz
	cysteínová proteáza	Blo t 1, Der f 1, Der m 1, Der p 1, Eur m 1	roztoče
		Ani s 4	červy
	serínová proteáza	Ale o 9, Blo t 9, Der f 9, Der f 25, Der p 9	roztoče
Api m 7, Per a 10, Pold4, Sim vi 2		hmyz	
Ani s 1		červy	
trypsín	Aca s 3, Blo t 3, Der f 3, Der p 3, Eur m 3, Tyr p 3	červy	
	Bla g 10	Hmyz	
Iné proteíny	FABP (proteín viažúci mastné kyseliny)	Aca13, Arg1, Bl13, Der 13, Der p13, Lep 13, Tyr p13	roztoče
	(lipokalin)	Bla g 4, na 4, Tria t 1	hmyz
	hemocyanín	Bed v hemo, Mac hemo, Pan b hemo Bla g 3, Per a3	kôrovce hmyz
	HSP70 (proteín teplotného šoku)	Der f 28 Aed na 8, Vesp na HSP70	roztoče hmyz

1.7.4. Vajcia a výrobky z nich

Vajcia patria k ľahko dostupným výživným potravinám a sú bohaté hlavne na lipidy a proteíny a v menšom množstve na vitamíny a minerály. Skladajú sa zo škrupiny (8-11%), žĺtka (27-32%) a albumínov (56-61%), z čoho albumín obsahuje 88,5% vody, 10,5% proteínov a 0,05% sacharidov. Vaječné alergény sú najviac obsiahnuté vo vaječnom bielku a patria tu ovalbumín, ovomukoid, ovotransferín a lyzozým. Ich množstvo v % uvádza Tabuľka č. 3. Nachádza sa tu aj avidín, ktorý je známy svojimi anti-nutričnými vlastnosťami. Vaječný žĺtok obsahuje antioxidanty, ktoré sú dôležité pre zdravie. Je známe, že štruktúra alergénov sa počas tepelného spracovania mení, čo znamená, že alergénosť sa tým pádom znižuje. Teplota, pri ktorej dochádza k strate alergenicity sa pohybuje od 50-60°C [25].

Alergia na vajcia postihuje prevažne deti už od útleho detstva. Popri alergii na vaječné proteíny sa často vyskytuje spolu s alergiou na mlieko [26].

Alergia na vajcia sa prejavuje na koži (urtikária, angioedém, vyrážka, ekzém), ďalej sa vyskytujú gastrointestinálne príznaky (zvracanie, bolesť brucha, hnačka) a v niektorých prípadoch sa objavujú aj problémy s dýchaním [27].

Tabuľka 3: Proteínové zloženie albumínu [25]

Proteín	Množstvo vo vaječnom bielku (%)
Ovalbumín	54-66
Ovotransferín	12-13
Ovomukoid	9,5-11
Lyzozým	2,3-4,5
Ovomucín	1,5-3,5
Ovoinhibitor	0,1-1,5
Ovoglobulín G2	1,0-6
Ovoglobulín G3	1,0-6
Proteín viažuci riboflavín	1,0
Avidín	0,05-0,5
Ovostáin	0,5

1.7.5. Ryby a výrobky z nich

Medzi časté alergizujúce potraviny patria aj ryby. Delia sa na kostnaté a chrupavkovité, pričom kostnaté ryby predstavujú primárny zdroj alergénov. Vo všeobecnosti je prevalencia alergie na ryby od 0,2% do 3%, avšak spotreba rýb sa neustále zvyšuje. V Európe človek najviac konzumuje lososa, tresku, tuniaka a slede. Hlavným alergénom rýb je parvalbumín, ktorý je prítomný vo všetkých stavovcoch. Delí sa na dva typy, α a β , ktoré sa líšia štruktúrne, biochemickými vlastnosťami a výskytom. α -parvalbumíny sú obsiahnuté v chrupavkách a β -parvalbumíny sú prevažne v kostnatých rybách. Alergia na ryby je nevyliciteľná. Jedná sa o celoživotné ochorenie, ktoré sa prejavuje nevoľnosťou, ekzémom, dýchacími ťažkosťami môže skončiť anafylaxiou [28].

1.7.6. Podzemnica olejná (arašidy) a výrobky z nej

Alergia na arašidy patrí k jedným z najzávažnejších potravinových alergií. Semená podzemnice olejnej obsahujú nebezpečné alergény, ktoré vyvolávajú u náchylných jedincov tvorbu IgE protilátok. Medzi hlavné arašidové alergény zaradzujeme proteíny Ara h 1, Ara h 2 a Ara h 3 a ďalšie (viď Tabuľka č. 4) [29]. Arašidový alergén je tak silný, že už len prítomnosť cudzej osoby, ktorá konzumuje arašidy vyvoláva u alergických ľudí okamžitú reakciu, ktorá môže skončiť anafylaktickým šokom. Človek alergický na arašidy musí byť maximálne ostražitý [30].

Arašidy obsahujú veľa bielkovín a tukov, ktoré prospievajú kardiovaskulárnemu systému. U citlivých jedincov však už 0,4 mg arašidov môže vyvolať prvotné príznaky alergickej reakcie, preto by sa títo jedinci mali úplne vyhnúť konzumácií arašidov. Problém spočíva v tom, že arašidy a arašidové múky sú súčasťou rôznych potravín. Arašidové múky sa pražia vo viacerých stupňoch, pričom pri pražení dochádza k chemickým a štruktúrnym zmenám arašidových proteínov [31].

Tabuľka 4: Alergény arašidov [32]

Alergén	Názov
Ara h 1	Cupín (typ vicilín, 7S globulín)
Ara h 2	Konglutín (2S albumín)
Ara h 3	Cupín (typ legumin, 11S globulín, glycín))
Ara h 4	premenovaný na Ara h 3.02, číslo nie je k dispozícii pre budúce podania
Ara h 5	Profilín
Ara h 6	Konglutín (2S albumín)
Ara h 7	Konglutín (2S albumín)
Ara h 8	Proteín príbuzný patogenéze, PR 10, Bet v 1
Ara h 9	Nešpecifický proteín transferu lipidov typu 1
Ara h 10	16 kDa oleosin
Ara h 11	14 kDa oleosin
Ara h 12	Defenzín
Ara h 13	Defenzín
Ara h 14	Oleosin
Ara h 15	Oleosin
Ara h 16	nešpecifický lipidový transferový proteín 2
Ara h 17	nešpecifický lipidový transferový proteín 1

1.7.7. Sójové zrná a výrobky z nich

Známostou „modernou“ potravinou súčasnej doby je sója. Hlavnými proteínmi sóje sú glycinín, tiež označovaný ako 11S globulín a β -konglycinín, predstavujúce 50-90% zásobných proteínov [33]. Ďalšie alergény sóji sú uvedené v Tabuľke č. 5. Alergia na sóju sa najčastejšie prejavuje po užití sójového mlieka a to kožnými (urtikária, angioedém), dýchacími a gastrointestinálnymi ťažkosťami. V niektorých prípadoch môže dôjsť aj k anafylaxii. Popri alergii na sóju sa až u 88% detí prejavuje aj alergia na arašidy, čo potvrdzuje skríženú reaktivitu medzi sójou a strukovinami [10].

Sójové zrná patria medzi strukoviny, ktoré sú pomerne výdatným zdrojom bielkovín a taktiež obsahujú veľké množstvo esenciálnych aminokyselín, ktoré sú pre človeka dôležité. Sójové zrná sú mierne toxické a preto je potrebné ich tepelne spracovať ešte pred využitím. Sója patrí medzi primárne potraviny vegetariánskej kuchyne. Zo sóji sa vyrába „sójové mäso“, sójové mlieko, sójový lecitín, sójový olej, sójové omáčky, sójové múčky a špeciálnou úpravou tofu [10].

Tabuľka 5: Alergény sóji [32]

Alergén	Názov
Gly m 1	-
Gly m 2	-
Gly m 3	Profilín
Gly m 4	Proteín súvisiaci s patogenézou, PR-10 Bet v 1
Gly m 5	β - konglycín (vicilín, 7S globulín)
Gly m 6	Glycinín (legumín, 11S globulín)
Gly m 7	Nový alergén odolný varu
Gly m 8	2S albumín

1.7.8. Mlieko a výrobky z neho

V Európe sa najčastejšie alergia na mlieko vzťahuje na kravské mlieko a je to jedna z bežných potravinových alergií, ktoré sa najviac prejavujú v období detstva. Jej prevalencia je 0,5-3% populácie. Proteíny kravského mlieka, medzi ktoré patria glykoproteíny α - laktalbumín, β -laktoglobulín a kazeín, sú pre zdravého človeka neškodné, avšak patria medzi alergény. Kazeíny tvoria 80% mliečnych proteínov a ostatných 20% sú srvátkové proteíny (viď Tabuľka č. 6). Problémom je, že ľudská IgE reakcia na kravské mlieko je charakterizovaná veľkou premenlivosťou, pretože alergický jedinec môže reagovať nielen na každý z týchto proteínov, ale navyše v rámci danej molekuly aj na rôzne epitopy [34].

V súvislosti s alergiou na mlieko sa často používa liečba orálnou potravinovou imunoterapiou. Hlavnou funkciou je obnoviť imunitnú toleranciu u alergických jedincov. Avšak stále je táto oblasť liečenia dostatočne nepreskúmaná a využívajú sa prísne eliminačné diéty [35].

Až v 50% prípadoch detí vo veku 4-5 rokov sa postupne vyvinie prirodzená tolerancia na mlieko. Tepelnou úpravou mlieka sa znižuje alergénnosť, nakoľko zahrievaním dochádza ku konformačným zmenám alergénových epitopov. To znamená, že deti s alergiou na mlieko (platí aj pri vajciach) sú schopné tolerovať mlieko (vajcia) obsiahnuté v tepelne upravených výrobkoch. Deti, ktoré tento alergén tolerujú, majú veľkú pravdepodobnosť, že si prirodzene vyvinú toleranciu na mlieko a vajcia [36].

Alergia na mlieko má súvislosť aj s materským mliekom, ktoré je hypoalergénne. Materské mlieko patrí k najlepším druhom mlieka. Kojenci, ktorí sú alergickí na kravské mlieko, alergiu na materské mlieko nemajú. Prostredníctvom matky a jej stravy môžu do materského mlieka

peniknúť alergény. Ak sa v rodine prejavila nejaká alergia na kravské mlieko, odporúča sa matkám počas kojenia mlieko vyradiť zo stravovania [30].

Tabuľka 6: Alergény kravského mlieka [34]

Časť kravského mlieka	Proteín	Kód alergénu	c [g/l]
srvátka (20%)	α - laktalbumín	Bos d 4	1 - 1,5
	β - laktoglobulín	Bos d 5	3 - 4
	hovädzie sérum albumín	Bos d 6	0,1- 0,4
	imunoglobulíny	Bos d 7	0,6 - 1
	laktoferín		0,09
	kazeíny (80%)	α S1- kazeín	Bos d 9
α S2- kazeín		Bos d 10	3 - 4
β -kazeín		Bos d 11	9 - 11
κ -kazeín		Bos d 12	3 - 4

1.7.9. Orechy

Ďalšou pomerne rozsiahlou skupinou alergizujúcich potravín sú orechy. Patria tu mandle, lieskové orechy, vlašské orechy, kešu, pekanové orechy, para orechy, pistácie, makadamové orechy a výrobky z nich. V Tabuľke č. 7 sú uvedené alergény orechov. Človek, ktorý je alergický na orechy by sa mal vyhýbať aj arašidom, avšak nie je to pravidlo [30].

Orechy majú vysokú nutričnú kvalitu, a preto sú súčasťou zdravej výživy. V súčasnosti sa konzumujú samé ako „snack“ alebo sú prítomné v jedlách, výrobkoch ako je čokoláda, marcipán, ochutená káva a taktiež v kozmetike [37].

Sú tiež bohaté na energiu, ktorá pochádza z veľkého obsahu tukov. Orechy obsahujú nenasýtené mastné kyseliny ako sú kyselina olejová, ale vyskytuje sa v nich aj značné množstvo zdraviu prospešných polynenasýtených mastných kyselín (PUFA). Okrem toho obsahujú sacharidy, vlákninu, bielkoviny, sodné minerály, polyfenoly a fytosteroly. Prítomné fytosteroly v orechoch prispievajú k zníženiu hladiny cholesterolu v krvi [38].

Tabuľka 7: Alergény orechov [37]

Orech	Alergén	Názov	Orech	Alergén	Názov
Lieskové orechy	Cor a 1	Bet v 1 (PR- 10)	Pekanové orechy	Auto i 1	2S albumín
	Cor a 2	Profilín		Auto i 2	Vicilín
	Cor a 8	nsLTP		Auto i 4	Legumin
	Cor a 9	Legumin	Mandle	Pru du 3	nsLTP
	Cor a 11	Vicilín		Pru du 4	Profilín
	Cor a 12	Oleosin		Pru du 5	
	Cor a 13	Oleosin		Pru du 6	Legumín
	Cor a 14	2S albumín	Kešu	Ana o 1	Vicilín
Vlašské orechy	Jug r 1	2S albumín		Ana o 2	Legumín
	Jug r 2	Vicilín		Ana o 3	2S albumín
	Jug r 3	nsLTP	Pistácie	Pis v 1	2S albumín
	Jug r 4	Legumin		Pis v 2	Legumin
	Jug r 5	Bet v 1		Pis v 3	Vicilín
	Jug r 6	Vicilín		Pis v	Mangánová superoxid dismutáza
	Jug r 7	Profilín		Pis v	Legumin

1.7.10. Zeler a výrobky z neho

Zeler poznáme v buľvovej, listovej a stonkovej podobe. Surový sa konzumuje v listovej a stonkovej podobe, kdežto buľvový sa spracováva varom. Hlavné alergény zeleru sú uvedené v Tabuľke č. 8. Alergia na zeler je úzko spojená so senzibilizáciou na peľ brezy. Medzi hlavné prejavy patrí orálny alergický syndróm, astma, urtikária, atopický ekzém a môže dôjsť aj k anafylaxii. Zeler je bohatý na furokumarín, ktorý vplyvom UV žiarenia vyvoláva fytofotodermatózu. Využíva sa bežne pri príprave jedál, v dresingoch, ale aj v známych koktejloch ako je Bloody Mary [10].

Tabuľka 8: Alergény zeleru [32]

Alergén	Názov
Api g 1	Bet v 1
Api g 2	Nešpecifický proteín lipidového transferu typu 1
Api g 3	Chlorofyl a-b väzbový proteín, chloroplast
Api g 4	Profilín
Api g 5	Radí sa do skupiny proteínov FAD-obsahujúci oxidázu
Api g 6	Nešpecifický proteín lipidového transferu typu 2

1.7.11. Horčica a výrobky z nej

Známou potravinou je aj horčica. Rozoznávame žltú horčicu, ktorá patrí k najpoužívanejším v Európe a orientálnu horčicu, ktorá ma významne zastúpenie v USA a Ázii. Všetky alergény horčice uvádza Tabuľka č. 9. Pridáva sa do nakladaných výrobkov, spracovaného mäsa, korenín, šalátových zálievok a omáčok, kde je často skrytou zložkou. Príznaky sa prejavujú od syndrómu orálnej alergie až po kožné reakcie ako je rozsiahly opuch vznikajúci na rôznych miestach, nazývaný angioedém, no môže sa vyskytnúť aj anafylaktický šok. V súčasnosti rastie skrížená reaktivita medzi horčicou a inými potravinami ako sú orechy, strukoviny a plody ružovitých rastlín. Medzi hlavné alergény žltej horčice patria proteíny Sin a 1, ktorý je stabilný pri tepelnom spracovaní a Sin a 2. Alergény Sin a 3, Sin a 4 sa najviac zúčastňujú na skríženej reakcii IgE s ovocím (napr. broskyňa, melón) [39].

Tabuľka 9: Alergény horčice [32]

Žltá horčica (<i>Sinapsis alba</i>)	Alergény	Názov
	Sin a 1	2S albumín
	Sin a 2	11S globulín
	Sin a 3	nešpecifický proteín na prenos lipidov, typ 1
	Sin a 4	Profilín
Orientálna horčica (<i>Brassica juncea</i>)	Bra j 1	2S albumín, proteín pre skladovanie semien
Polná horčica (<i>Brassica rapa</i>)	Bra r 1	2S albumín
	Bra r 2	Prohevein homologue

1.7.12. Sezamové semená a výrobky z nich

Alergia na sezamové semeno sa vyskytuje prevažne u detí a je rozšírená najmä v Austrálii a Izraeli, nakoľko sezam nemá pôvod v Európe [40]. Sezam je známy rastlinný produkt už od dôb staroveku. Patrí k výživným produktom, ale vďaka obsahu lignanov sa mu pripisujú aj liečivé vlastnosti. Okrem lignanov obsahuje aj sezamín a sesamolín, ktoré predstavujú hlavné sekundárne metabolity vo svojich semenách [41].

Sezamové semeno obsahuje približne 20% bielkovín, z ktorých 2S albumín je hlavným alergénom sezamových semien. Ostatné alergény sú uvedené v Tabuľke č. 10. Hlavné príznaky alergie sú žihľavka, angioedém, dýchacie ťažkosti a rovnako ako u alergie na orechy a arašidy vedie k anafylaxii. V Európe sa sezamové semená používajú na polievky, buchty hamburgerov, bagety, tyčinky a pečivo všeobecne [40].

Tabuľka 10: Alergény sezamových semien [32]

Alergén	Názov
Ses i 1	2S albumín
Ses i 2	2S albumín
Ses i 3	7S vicilín (ako globulín)
Ses i 4	oleosin
Ses i 5	oleosin
Ses i 6	11S globulín
Ses i 7	11S globulín

1.7.13. Oxid siričitý a siričitany

Alergia na sulfity sa vyskytuje najčastejšie u astmatikov. Sulfity (siričitany) sú známe ako konzervačné látky vyskytujúce sa v potravinách, nápojoch a liekoch. Zachovávajú chuť a farbu potravín, bránia rastu baktérií, znižujú kazenie potravín a uchovávajú stabilitu liekov. V mnohých krajinách je nezákonné pridávať siričitany do potravín ako sú napríklad čerstvé šaláty, mäso ako je mleté mäso alebo klobása, no napriek tomu väčšina krajín povoľuje pridávať siričitany do piva a vína. Prítomnosť sulfitov musí byť označená kódovými číslami E220-228. Jedná sa o sulfity v koncentráciách vyšších ako 10 mg/kg alebo 10 mg/l vyjadrené ako SO₂ [42].

Alergia na siričitany sa prejavuje sipotom, problémami s dýchaním a bolesťou hlavy. Pri sušenom ovocí je potrebné prečítať si etiketu spracovanej potraviny, či náhodou neobsahuje siričitany. Prehľad najbežnejších zdrojov siričitanov je uvedený v Tabuľke č. 11 [30].

Tabuľka 11: Najbežnejšie zdroje siričitanov [42]

Nápoje	likér, ovocný džús, pivo, víno, nealkoholické nápoje, instantný čaj
Iné kvapaliny	komerčné prípravky z citrónovej a limetkovej šťavy, ocot, grepový džús
Komerčné potraviny	suché zemiaky, omáčky, ovocné polevy, čerešne, javorový sirup, džem, želé, sušienky, chlieb, koláče, cesto na pizzu
Ovocie	sušené marhule, niekedy hrozno (pri preprave so sáčkom obsahujúci konzervanty-sulfity)
Šaláty	reštaurácia môže pridať sulfity pre zachovanie farby šalátov
Kôrovce	na povrch kôrovcov sa môže pridávať sulfitový prášok (zabránenie zafarbeniu)
Mäso	nelegálne pridávanie
Iné potraviny	želatina, kokos

1.7.14. Vlčí bôb a výrobky z neho

Vlčí bôb, tiež nazývaný aj lupina, je známa strukovina. Poznáme „sladký vlčí bôb“, ktorý sa delí na biely vlčí bôb, najviac využívaný v potravinárskom priemysle, ďalej žltý vlčí bôb a modrý vlčí bôb. Lupina obsahuje vysoké percento bielkovín, nízky obsah tukov a škrobu a primerané množstvo vlákniny. Semená lupiny sa svojím bohatým obsahom bielkovín podobajú sójovým bôbom. Alergická reakcia na lupinu je sprostredkovaná senzibilizáciou alebo IgE, a to ako primárna odpoveď alebo ako výsledok skríženej reaktivity s inými známymi strukovínami, najmä s arašidmi. Hlavným alergénom je β - konglutín, označovaný ako Lup an 1 [43].

Medzi výrobky, ktoré môžu obsahovať vlčí bôb, patria cereálie, cestoviny, pečivo, sušienky, cibuľové krúžky, pizza a ázijské fermentované potraviny. Lupín neobsahuje glutén, a preto sa vlčia múka a vlčí bôb používajú v bezpečných výrobkoch. Taktiež sa môže používať ako náhrada vajec alebo sóje v potravinárskych výrobkoch. Okrem toho má využitie aj ako krmivo pre zvieratá a hnojivo v pôde [44].

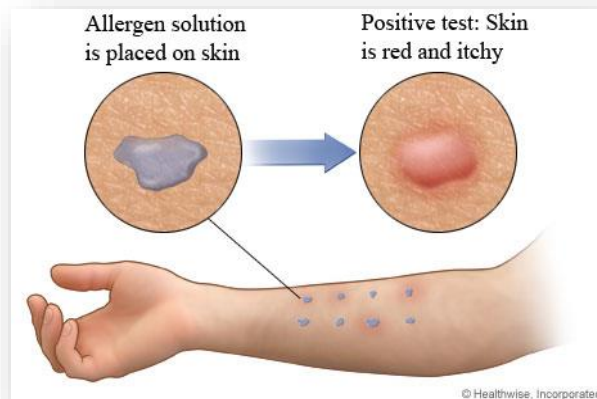
2. MOŽNOSTI DETEKČIE POTRAVINOVÝCH ALERGÉNOV

Alergény majú mnoho podôb a reakcia na ne sa prejavuje symptómami rôzneho druhu, od miernych kožných prejavov, cez problémy s gastrointestinálnym traktom, až po životu ohrozujúcu anafylaxiu. Preto je nesmierne dôležité určiť nielen typ alergénu, ale taktiež vyvíjať dostatočne citlivé a spoľahlivé metódy, ktoré sú schopné odhaliť prítomné alergény v potravinách. K týmto účelom používame diagnostické metódy, prostredníctvom ktorých môžeme určiť či jedinec má, respektíve nemá reálnu potravinovú alergiu a detekčné metódy, ktorými sa stanovujú alergény v potravinách [45].

2.1. Diagnostické testy potravinovej alergie

2.1.1. Kožné prick testy

Kožné prick testy, tzv. SPT (skin prick test), tvoria základ pri diagnostike potravinovej alergie. Jedná sa o „vpichové“ testy, ktoré sa vykonávajú s použitím štandardizovaných, dostupných extraktov alebo s použitím natívnych potravín (potravín ako takých). V súčasnosti sú natívne („prick-to-prick“) testy preferovanejšie. Výhodou je, že k testovaniu je možné použiť neobmedzené spektrum potravín. Praktické prevedenie kožných prick testov spočíva v tom, že na vnútornú stranu predlaktia sa nanesú kvapky testovaného alergénu a hrotom štandardizovanej testovacej ihličky sa vpichne cez kvapky tak, aby sa narušila jednotnosť pokožky a telo mohlo na daný alergén zareagovať. Vyhodnotenie prebieha v priebehu 15-20 minút. Hodnotí sa najväčší rozmer pupenca (edému) v milimetroch (viď obr. 5). Za pozitívny výsledok je považovaný rozmer pupenca ≥ 3 mm. S veľkosťou pupenca rastie pravdepodobnosť, že daná potravina je skutočne príčinou alergie. Kožné prick testy je možné vykonať u detí už v priebehu prvých šiestich mesiacov života, ale aj u pacientov vyšších vekových kategórií, vekový limit neexistuje. Rizikové potraviny pri stanovení môžu byť orechy, semená, ryby, morské plody, avšak neznamená to, že by mali byť z testovania vyradené [10, 46].



Obrázok 5: Kožné prick testy s výsledným pupencom [47]

2.1.2. Stanovenie špecifického IgE (sIgE)

Tak ako kožné prick testy, tak aj stanovenie špecifického IgE má v diagnostike potravinovej alergie veľký význam. Špecifický IgE predstavuje jediný diagnostický biomarkér pre expozíciu a senzibilizáciu pri alergii [48].

Špecifický IgE sa môže merať viacerými spôsobmi. Najpoužívanejšie sú enzýmová imunoanalýza na pevnej fáze (ELISA), enzýmový test alergénu na pevnej fáze (EAST), imunoanalýza fluorescenčných enzýmov (FEIA), rádiový test alergénu na pevnej fáze (RAST) a imunoblotovanie. Meranie sIgE zahŕňa použitie alergénov naviazaných na pevnú fázu na zachytenie IgE a je kvantifikované použitím značených anti-IgE protilátok. Hladina špecifických IgE protilátok je vyjadrovaná v IU/ml, čo predstavuje jednotky alergénu. Tieto testy sa vykonávajú najmä v komerčných a výskumných laboratóriách. Neexistujú žiadne medzinárodné štandardy pre špecifické testy IgE [49].

Vyšetrenie sIgE nie je vekovo obmedzené, odber krvi sa dá uskutočniť kedykoľvek, nie je nevyhnutné vysadenie liečby. Pre stanovenie sIgE sa používajú najčastejšie „screeningové“ zmesi potravín označované ako fx5 (bielko, mlieko, pšenica, ryba, arašid a sója). Jedná sa o zmesi alergénov z nepríbuzných zdrojov. Dostupné sú aj zmesi alergénov z príbuzných zdrojov (zmes ovocia, zmes orechov), ďalej jednotlivé „klinické“ alergény (alergénové extrakty) a jednotlivé zložky. Pri výbere alergénov pre stanovenie sIgE sa zohľadňuje vek, anamnéza, predpokladaná skrížená reaktivita a orgánové symptómy. Výhoda stanovenia sIgE je pri rozsiahlejšom postihnutí kože, kedy sa nedá použiť SPT a taktiež u pacientov, ktorí nespolupracujú (väčšinou malé deti) [10].

Hladina sIgE je normou stanovená pod 0,35 IU/ml (prípadne kU/l). Čím vyššia je hodnota sIgE, tým väčšia je pravdepodobnosť, že pacient má reálnu potravinovú alergiu. Pre niektoré potraviny boli zavedené cut-off hodnoty, pri ktorých prekročení je pravdepodobná reálna potravinová alergia. Hladiny „cut-off“ sIgE základných potravín sú uvedené v Tabuľke č. 12 [50].

Tabuľka 12: Hladiny „cut-off“ sIgE vzťahnuté k PPV (obvykle $\geq 95\%$) [10]

Alergén	sIgE (IU/ml)	Senzitivita (%)	Špecifita (%)	PPV (%)
mlieko do 2 rokov veku	5	-	-	95
mlieko od 2 rokov veku	15	57	95	95
vajcia do 2 rokov veku	2	-	-	95
vajcia od 2 rokov veku	7	61	84	98
stromové orechy	15	15	-	95
arašid	14	57	100	100
pšeničná múka	26	61	92	74
sója	30	44	94	73
ryby	3	63	91	56

PPV: pozitívna prediktívna hodnota

2.1.3. Kožné náplast'ové testy

Tento druh testov patrí medzi ďalšie metódy testovania v diagnostike potravinovej alergie. APT (atopy patch testy) sú klasické modifikované epikutánne dermatologické testy používané k diagnostike alergie, kedy sa do komôrky nanáša potravinový alergén. APT testy slúžia k detekcii senzibilizovaných T-lymfocytov. V porovnaní s prick testami, majú APT nižšiu senzitivitu, ale vyššiu špecifitu, čo je znázornené v Tabuľke č. 13. Tieto testy sú prospešné najmä u malých detí s atopickou dermatitídou [50].

Pri APT sa testáčna komôrka, ktorá obsahuje alergén prilepí na neporušenú časť kože, kde sa nenachádza ekzém, najčastejšie na chrbát. Doba, kedy musí byť komôrka prilepená na koži je 48 hodín [51].

Odčítanie výsledku je treba posudzovať v čase. Po 48 hodinách sa odstráni náplast', avšak výsledok sa odčítava dve až tri hodiny po odlepení. Nutné je výsledky odčítať aj po 72 hodinách od nalepenia, čo pomáha odlíšiť iritačné reakcie od imunologickej precitlivenosti. Za pozitívny výsledok sa považuje vznik erytrému, papul a vezikul. Problémom APT je, že neexistujú medzinárodné alergénne štandardy. Najčastejšie sa používajú natívne potraviny zmiešané

s bielou vazelínou v pomere 2:1 (2 diely potraviny k 1 dielu vazelíny). Pred testovaním je nutné vysadiť antihistaminika [10].

Tabuľka 13: Porovnanie senzitivity a špecificity rôznych testov (APT,SPT,sIgE) u potravinovej alergie [10]

Potravina		APT	SPT	sIgE
kravské mlieko	senzitivita	52,80%	87,90%	87,30%
	špecificita	88,10%	67,50%	47,70%
vajce	senzitivita		92,40%	93,40%
	špecificita		58,10%	49,20%
arašid	senzitivita		94,70%	96,30%
	špecificita		61,00%	59,30%
pšenica	senzitivita		72,60%	83,20%
	špecificita		73,30%	42,70%

2.1.4. Expozičné testy

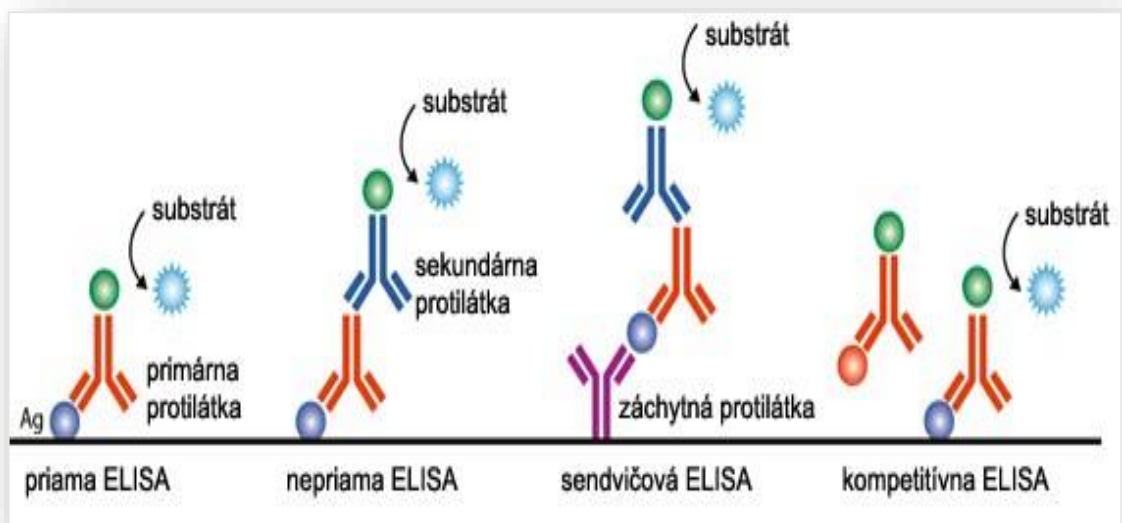
V súčasnej dobe sú expozičné testy dostupné len na niektorých pracoviskách v ČR, a tak je táto diagnostika potravinovej alergie obmedzená. V praxi sa najviac používajú otvorené expozičné testy, kedy je potravina podávaná v bežne konzumovanej podobe (mlieko, varené vajce, chlieb, obilná kaša, mleté orechy, mleté arašidy, sójové mlieko, jogurt, ovocie, zelenina, varená ryba, varené mäso). Potravina sa podáva postupne v 20-30 minútových intervaloch, pričom celková dávka by mala odpovedať bežnej porcii. Počas testovania sa hodnotia objektívne (zvracanie, kýchanie, kašeľ, opuchy, slzenie očí, erytém) a subjektívne (OAS, pálenie nosa, ťažké dýchanie, nauzea, slabosť, bolesť brucha) príznaky. Za pozitívny expozičný test sa považuje zaznamenanie objektívnych príznakov alergickej reakcie a tým pádom je expozičný test dostačujúci [50].

2.2. Kvantitatívne a kvalitatívne metódy stanovenia potravinových alergénov

2.2.1. ELISA

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) je jednou z najbežnejších imunologických metód široko využívaných v potravinárskom priemysle. Detekuje alergénne proteíny na základe interakcie daného antigénu s protilátkami. Jedná sa o veľmi citlivú metódu, avšak počas spracovania potravín ako je napríklad tepelné ošetrenie môže dôjsť k ovplyvneniu konformácie a kvality proteínov, čo môže mať za následok zavádzanie výsledku skriženou reaktivitou (napríklad u arašidov s inými orechmi). Ďalšou nevýhodou je, že testovacie súbavy ELISA detekujú len jeden alergén v jednej analýze [52].

Princíp ELISA metódy je založený na imuno-rozpoznávacom kroku, ktorý zahŕňa špecifickú reakciu medzi protilátkou a antigénom. V režime rozpoznávania sú protilátky hlavnou jednotkou a podľa rozpoznávacích modelov sa ELISA delí na priamu, nepriamu, sendvičovú a kompetitívnu, ktorých usporiadanie je znázornené na obr. 6 [53].

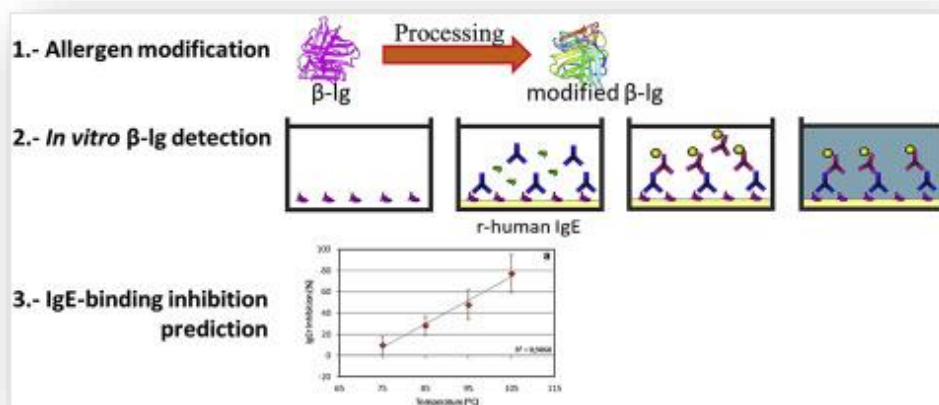


Obrázok 6: Možnosti usporiadania ELISA [54]

Najpoužívanejšia pri detekcii potravinových alergénov je sendvičová ELISA. Tá používa dva druhy protilátok. Jedna z nich pôsobí ako adsorbent a imobilizuje na pevnom substráte a slúži k zachyteniu antigénov zo vzorku, a druhá z nich s protilátkou označenou enzýmom pôsobí ako signál-generujúca molekula, zodpovedná za identifikáciu antigénu a

prostredníctvom enzýmu použitého ako značky druhej protilátky katalyzuje premenu substrátu pridaného do reakcie. Vzniknutý produkt spôsobí zmenu farby chromogenného činidla, ktoré sa pridáva so substrátom aby bola možnosť spektrofotometrickej detekcie. Pre arašidové alergény sa využíva niekoľko testovacích súprav ELISA, ktoré sú už komerčne dostupné, ako sú Veratox, BioKits, ELISA-TEK a Ridascreen. LOD (limit detekcie) týchto súprav je 1-5 ppm [53].

Orcajo a kol., 2019, vyvinuli štandardizovateľnú metódu na základe rekombinantných IgE protilátkach, ktoré zabezpečili špecifickú detekciu škodlivého obsahu potravy pre senzibilizovanú osobu proti β -laktoglobulínu, ktorá odhaľuje a meria zmeny imunoreaktivity β -laktoglobulínu vyvolané technologickými procesmi v potravinách obsahujúcich túto mliečnu bielkovinu. Hranica detekcie pre rozoznávanie β -laktoglobulínu je LOD $< 0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$. Táto technika, zobrazená v skratke na obr. 7 taktiež detekuje modifikácie väzby β -Ig-IgE po spracovaní potravín (tepelná úprava). [55].



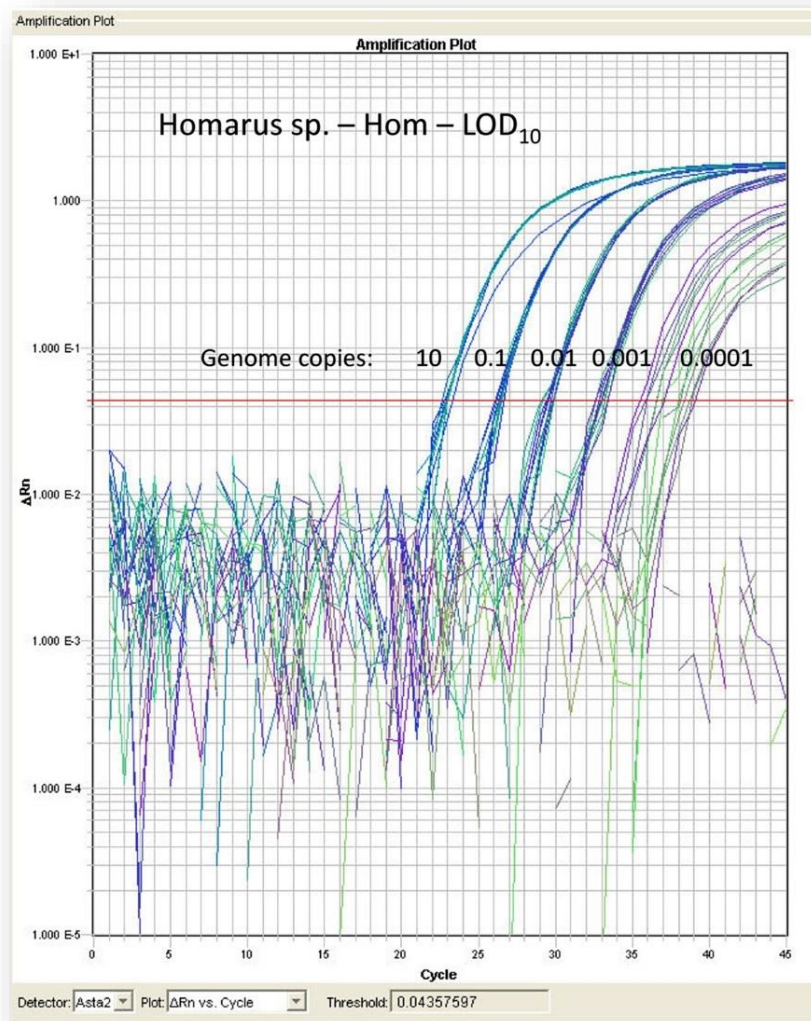
Obrázok 7: ELISA založená na rekombinantných IgE protilátkach voči β -laktoglobulínu [55]

2.2.2. Metódy na báze DNA

DNA metódy sú rýchle, citlivé a slúžia na priamu detekciu proteínov bez veľkých zariadení. Tieto metódy zahŕňajú polymerázovú reťazovú reakciu (PCR), digitálnu PCR, elektrochemické či optické biosenzory. Výhodou je, že DNA je stabilnejšia pri spracovaní potravín, ale aj pri extrakcii v porovnaní s proteínom. Cieľom DNA pre tieto metódy sú gény, ktoré kódujú alergénny proteín alebo iný DNA markér. Na zlepšenie presnosti a citlivosti metód založených na báze DNA môže mať veľký vplyv skríning fragmentov DNA [52]. Metóda PCR sa bežne

používa na monitorovanie alergénnych zložiek počas spracovania potravín. Je vysoko špecifická s možnosťou automatizácie [56].

Zagon a kol., 2017, vyvinuli na detekciu kôrovcov v potravinách skriningový test fungujúci na báze PCR v reálnom čase (RT-PCR), ktorý je založený na detekcii mitochondriálnych 16S rRNA génových sekvenciách, pričom boli optimalizované tak, aby sa mohli spúšťať so štandardným programom pri teplote 60°C. Citlivosť PCR systémov sa pohybovala v rozmedzí 0,01-0,1 genómových kópií, resp. 0,04-2,5 pg DNA. Výsledok detekcie je zobrazený na obr. 8. Priméry a sondy boli nanesené vopred na 96-jamkové PCR doštičky s trehalózou, ktorá má úlohu ochranného činidla. Tento test umožňuje detekciu viacerých druhov kôrovcov [57].

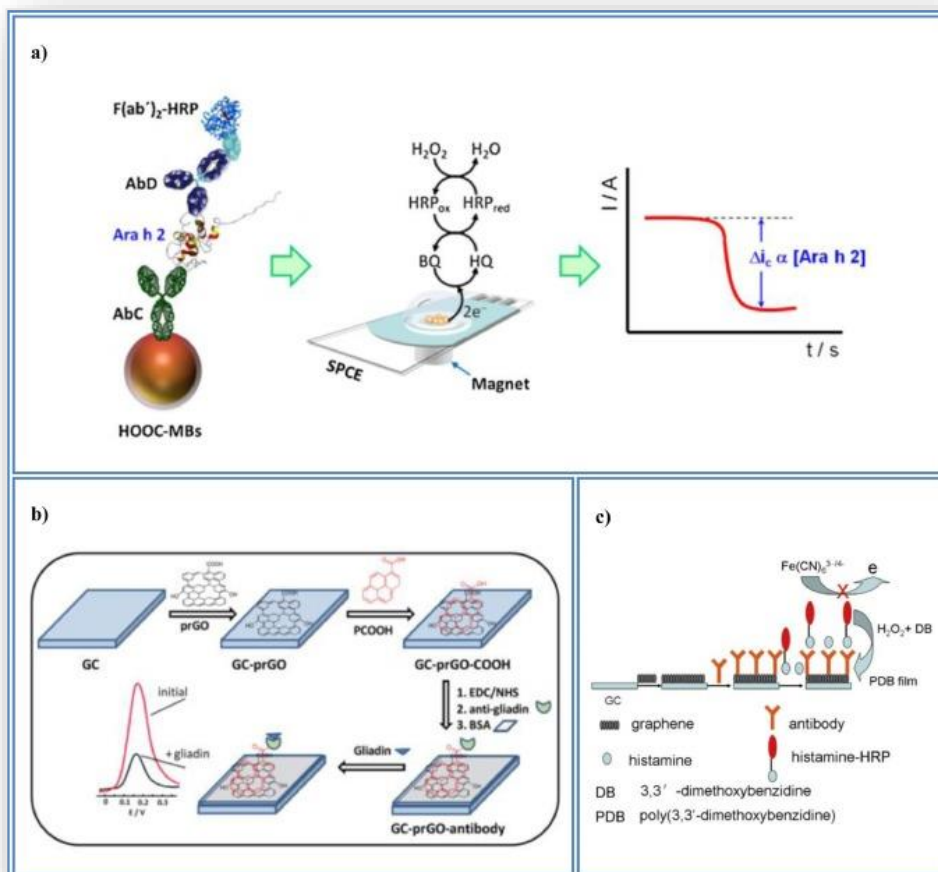


Obrázok 8: Výsledné amplifikačné krivky systému Hom (Homarus sp.) v LOD₁₀ stanovení [57]

2.2.3. BIOSENZORY

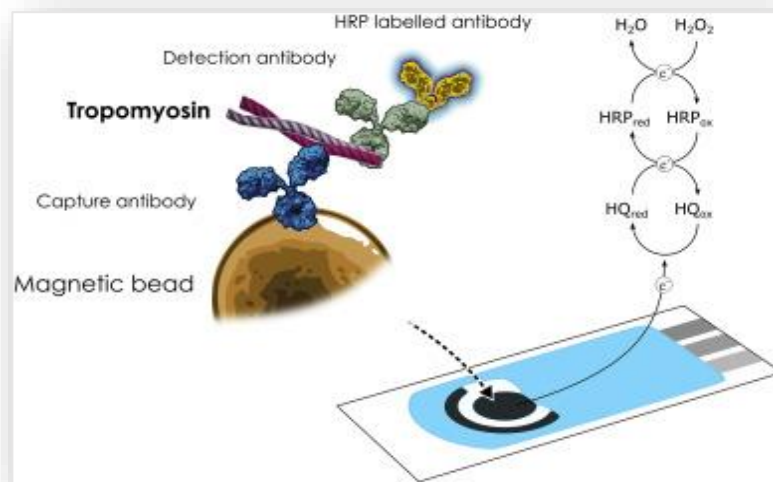
Biosenzory sú analytické zariadenia, ktoré slúžia na detekciu biologických látok (protilátky, enzýmy, jednovláknová DNA, aptaméry). Skladajú sa z troch častí: bioreceptor analytu imobilizovaný na povrchu elektródy, prevodník a systém na spracovanie signálu. Podľa svojich transdukčných módov rozoznávame niekoľko typov biosenzorov. Môžu byť optické, elektromechanické a elektrochemické. Na detekciu potravinových alergénov sa využívajú najviac elektrochemické biosenzory, ktoré predstavujú samostatný biosenzor, ktorý poskytuje semikvantitatívne alebo kvantitatívne údaje na základe elektrochemického snímača [58].

Elektrochemické biosenzory používajú na povrchu elektród imobilizovanú protilátku na selektívne viazanie analytu a väzba je detekovaná zmenou prúdu alebo napätia na stanovovanom povrchu. Hosu a kol., 2018, použili zachytávacie a detekčné protilátky, ktoré boli implementované na magnetických perličkách upravených karboxylovou kyselinou a potom boli magneticky zachytené pod povrchom uhlíkovej elektródy pomocou ampérometrickej detekcie s použitím systému hydrochinónu (HQ)/ H_2O_2 . Sendvičový imunosenzor na obr. 9, ktorý je na báze magnetických perličiek (MBs) zobrazuje kovalentné väzby primárnej protilátky na povrch COOH-MBs cez amidové skupiny. Sekundárna protilátka bola označená chrenovou peroxidázou (HRP). Pre α -laktalbumín sa získal LOD 11,0 pg/ml a pre β -laktoglobulín LOD 0,8 ng/ml. Cieľové proteíny boli vložené medzi zachytávacie protilátky a detekčnú protilátku. Pre Ara h 1 biotinylovaná detekčná protilátka (b-AbD-Ara h 1) a pre Ara h 2 non-biotinylovaná detekčná protilátka (AbD-Ara h 2), ktoré sa v ďalšom kroku spojili so streptavidín-HRP (Ara h 1) a HRP-konjugovanej sekundárnej protilátky. Ara h 1 a Ara h 2 boli detekované postupom opísaným vyššie. LOD pre Ara h 1 bol 6,3 ng/ml a 0,026 ng/ml pre Ara h 2. [59].



Obrázok 9: Detekcia alergénov pomocou biosenzorov a) Schematické znázornenie prípravy biosenzora na báze sendvičových magnetických guľičiek pre α -laktalbumín. b) Elektrochemický imunoglobulín bez gliadínu. c) Schéma prípravy biosenzora a detekčného procesu histamínu [59]

Angulo a kol., 2019, vyvinuli elektrochemický imunosenzor na stanovenie tropomyozínu u kreviet (rozsah v ppm). Je založený na ampérometrickej transdukcií magnetických častíc a využíva jednorázové tlačené elektródy. Prístup spočíva na implementácii sendvičového imunoanalytického formátu na povrchu magnetických guľôčok a ich väzbe na jednorázové elektródy na výslednú amperometrickú odozvu pri -200mV oproti Ag pseudo-referenčnej elektróde, s použitím H_2O_2 ako enzýmového substrátu a hydrochinónu ako redoxného mediátora (vid' obr. 10). Použitie magnetických častíc viedlo k zlepšeniu výslednej citlivosti. LOD vyvinutého imunosenzora bol 47 pg ml^{-1} a pre stanovenie tropomyozínu kreviet poskytuje veľkú selektivitu voči tropomyozínu z iných zdrojov, čo znamená diferenciáciu medzi kôrovcami (krevety) a mäkkýšmi (chobotnice). Okrem toho použiteľnosť imunosenzora umožňuje stanovenie ako v surových potravinách, tak aj vo varených potravinách [60].



Obrázok 10: Schéma sendvičovej imunosenzibilizačnej platformy

(na stanovenie tropomyozínu a reakcií zapojených do amperometrickej detekcie) [60]

2.2.4. POVRCHOVÁ PLAZMÓNOVÁ REZONANCIA (SPR)

Ďalšou využiteľnou technikou, ktorá bola pre tieto účely popísaná je povrchová plazmónová rezonancia. Jedná sa o kvantitatívnu analytickú techniku, ktorá je založená na imobilizácii požadovanej molekuly (detekujúcej protilátky) na povrchu senzorového čipu a merania jeho väzbovej aktivity s inými molekulami (antigénmi). V porovnaní s ELISA testom je táto detekčná metóda bez značenia, pretože nevyžaduje označenie molekúl na detekciu. Je výhodná napr. na detekciu β -laktoglobulínových alergénov ako modelových proteínov v komplexnej potravinovej matrici (mlieko) a taktiež na detekciu kazeínu v mlieku [61].

Na detekciu potravinových alergénov sa používajú SPR biosenzory. V súčasnosti existujú štyri typy, ktoré sú zobrazené v Tabuľke č. 14. SPR biosenzory merajú kinetiku a afinitu bimolekulárnej väzby v reálnom čase, bez značenia a s nízkou spotrebou činidla. Schematické znázornenie kvantitatívnych platforiem založených na SPR biosenzore pre detekciu potravinových alergénov je na obr. 11. Biosenzory povrchovej plazmónovej rezonancie merajú zmenu indexu lomu spôsobenú interakciou bimolekúl s povrchom biosenzoru. V skratke optický systém generuje dopadajúce svetlo, snímací systém prevádza signál na zmenu rezonančného uhla alebo vlnovej dĺžky a detekčný systém meria veľkosť rezonančného uhla alebo vlnovej dĺžky. Jedná sa o vysoko citlivú optickú snímaciu technológiu [56].

Tabuľka 14: Typy, zloženie a výhody SPR biosenzorov (na detekciu potravinových alergénov) [56]

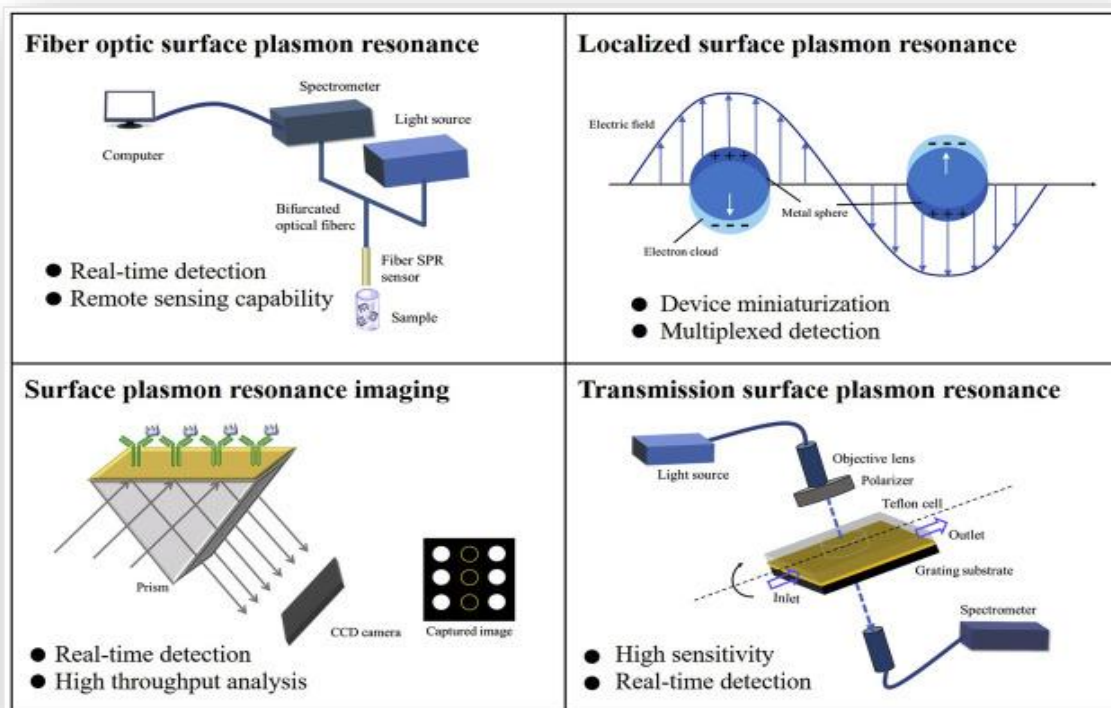
Režim detekcie	Základné zloženie	Výhody
*FOSPR	<ul style="list-style-type: none"> • zdroj svetla • snímacie sondy: citlivá vrstva, kovová fólia a jadro • vzorka bunky • detektor 	<ul style="list-style-type: none"> • vysoká stabilita • vysoká citlivosť • detekcia v reálnom čase • detekcia na dlhé vzdialenosti
*SPRITE	<ul style="list-style-type: none"> • svetelný zdroj • hranol Kretschmann • kovový film • vzorka bunky • zobrazovanie CCD (Charge Couped Device) 	<ul style="list-style-type: none"> • vysoká citlivosť • miniaturizácia zariadenia • multiplexná detekcia
*LSPR	<ul style="list-style-type: none"> • svetelný zdroj • nanoštruktúry vzácnych kovov • vzorka bunky • detektor 	<ul style="list-style-type: none"> • detekcia bez štítkov • detekcia v reálnom čase • vysokokapacitná analýza
*TSPR	<ul style="list-style-type: none"> • zdroj svetla • substrát • vzorka bunky • kovový film • detektor 	<ul style="list-style-type: none"> • vysoká citlivosť • detekcia v reálnom čase

*FOSPR- rezonancia povrchových plazmónových vlákien z optických vlákien

*SPRITE- zobrazovanie povrchovej plazmónovej rezonancie

*LSPR- lokalizovaná povrchová plazmónová rezonancia

*TSPR- rezonancia povrchového plazmonového plazmónu

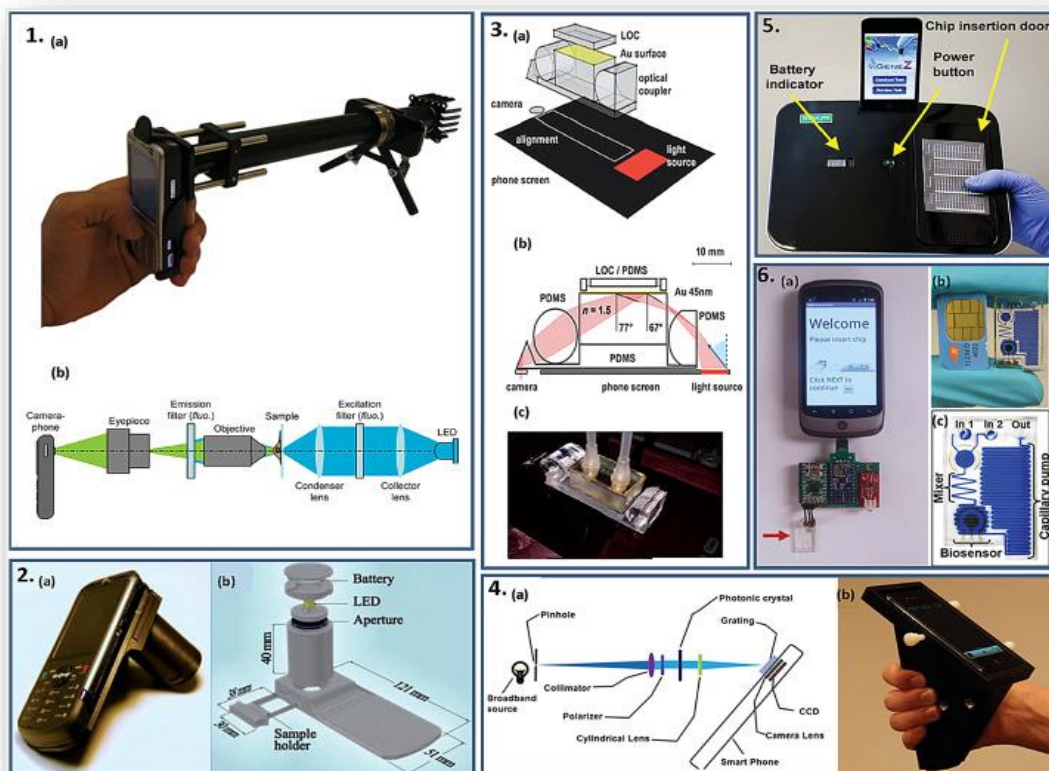


Obrázok 11: Znáročnenie kvantitatívnych platform založených na SPR biosenzore

pre detekciu potravinových alergénov [56]

2.2.5. POC technológia

V súčasnosti táto nová technológia “point of care“ zahŕňa viacero návrhov, ako sú napríklad vreckové, miniatúrne platformy a platformy s možnosťou prepojenia s inteligentným telefónom. V princípe jedno ručné biosenzorové zariadenie na čípe dokáže detekovať mono- a dvojvrstvové proteíny až do hrúbky troch nanometrov. Smartphone sa môže použiť priamo ako rozhranie senzora, čím ponúka nový potenciál pre detekciu alergénov. Táto technológia znázornená na obr. 12 umožňuje detekciu alergénov v širokom spektre potravín. Jedná sa o vajčička, mlieko, arašidy, lepok a ryby [58].



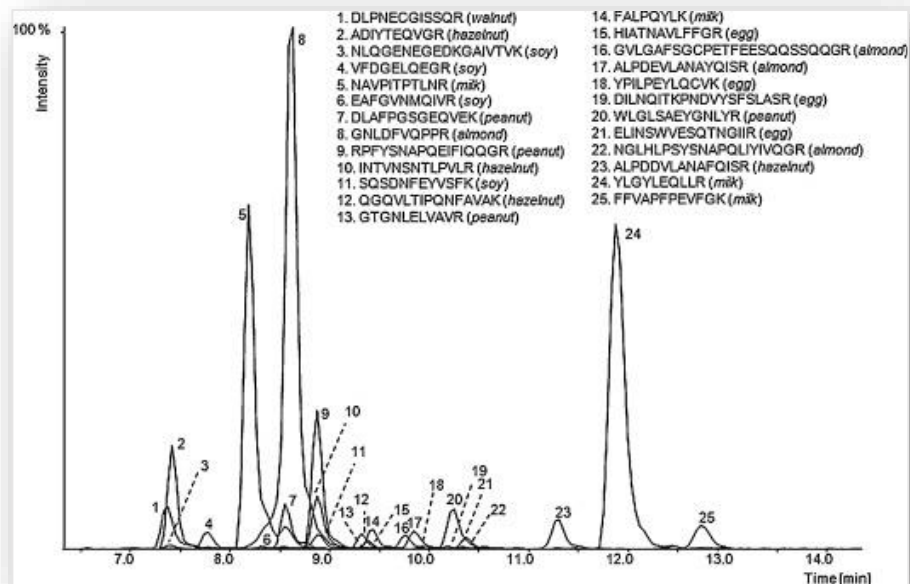
Obrázok 12: POC biosenzor na báze Smartphone [58, s. 18]

2.2.6. HPLC-MS/MS

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia spojená s metódou tandemovej hmotnostnej spektrometrie (ďalej HPLC-MS/MS) pre analýzu alergénov v potravinách patrí medzi citlivé a špecifické metódy na detekciu viacerých potravinových alergénov súčasne v surových a spracovaných vzorkách [62].

Metóda založená na hmotnostnej spektrometrii je užitočným nástrojom na skríning alergénov. Heick a kol., 2011, využili túto metódu na detekciu siedmich alergénov (mlieko, vajcia, sója, lieskové oriešky, arašidy, orechy a mandle), založenú na kvapalinovej chromatografii a trojnásobnej kvadrupólovej hmotnostnej spektrometrii vo viacnásobnom reakčnom režime. Monitorovanie viacerých reakcií je zobrazené na obr. 13. Pozostávala z extrakcie (pomocou TRIS-HCl, pH=8,2 pri 60°C, 3 hodiny) alergénnych proteínov z potravinovej matrice a následným enzymatickým štiepením trypsínom. Štiepenie sa zastavilo prídavkom 2 μ l koncentrovanej kyseliny mravčej a vzorky boli injikované do HPLC. Mobilnú fázu tvorila 0,05% kyselina mravčia a 10% ACN (acetonitril) vo vode (rozpušťaadlo A) a 0,05% kyselina mravčia v ACN (rozpušťaadlo B). Výsledné peptidy sa separovali pomocou HPLC

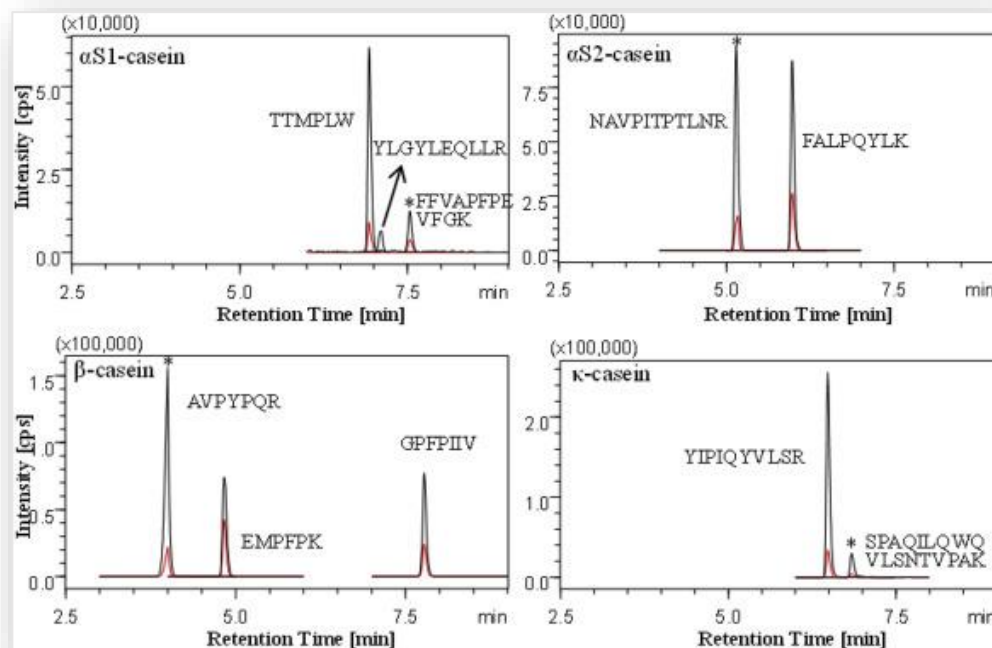
a boli merané trojnásobným kvadrupólovým hmotnostným spektrometrom v režime viacerých reakcií na zvýšenie citlivosti. Táto metóda bola použitá na zistenie všetkých spomenutých siedmich alergénov z referenčného chlebového materiálu, ktorý bol pečený podľa štandardného receptu. Zistené koncentrácie sa pohybovali od 10 do 1000 $\mu\text{g/g}$ [63].



Obrázok 13: Monitorovanie režimu viacerých reakcií siedmich alergenných potravín

(pre chlieb obsahujúci 1000 ppm) [63]

Kailun Qi a kol., 2019, použili na detekciu mliečnych alergénov v pečenom jedle rýchlu a špecifickú metódu UPLC-MS/MS (ultra-vysokovýkonná kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou) s použitím trávenia PHMN-trypsínu (imobilizovaný trypsín), ktorý slúžil na úpravu vzorky. Aplikácia štiepenia PHMN-trypsínu pri detekcii potravinových alergénov skráti čas prípravy vzorky a zvýši priepustnosť. Výsledné peptidy boli oddelené ultra-vysokovýkonnou kvapalinovou chromatografiou. Mobilná fáza pozostávala z vody s 0,1% kyseliny mravčej (rozpúšťadlo A) a ACN s 0,1% kyseliny mravčej (rozpúšťadlo B). Vzorka bola analyzovaná pomocou MS na hmotnostnom spektrometri LCM-8060 s iónom elektrospreja v pozitívnom móde (ESI+). Výsledný záznam je na obr. 14. Táto metóda je vhodná na kontrolu kvality potravín [64].



Obrázok 14: UPLC-MS/MS chromatogram cieľových peptidov

(pre α S1-kazeín, α S2-kazeín, β -kazeín, κ -kazeín) [64]

2.2.7. Hmotnostná spektrometria- MS

Donedávna bola hmotnostná spektrometria (ďalej MS) zameraná prevažne na charakterizáciu proteínov než na kvantifikáciu. Nová generácia hmotnostných analyzátorov vďaka svojmu výkonu vyvinula metódy MS, ktoré sú schopné stanoviť kvalitatívne aj kvantitatívne informácie o alergénoch v potravinách. Pokiaľ ide o detekciu alergénov založených na MS, sú k dispozícii dve možnosti. Prvou z nich je detekcia intaktného proteínu predstavujúceho alergénnu zložku a druhou je detekcia cieľových analytov (markérov), ktoré sú signálnymi peptidmi a zároveň výsledkom enzymatického štiepenia alergénnej zložky. V oboch prípadoch je rozhodujúci odber vzorky. Obsah proteínu/peptidu by sa mal vzťahovať na obsah vhodného štandardu celého proteínu alebo odvodeného peptidu, ktorý je pravdepodobne izotopovo značený. Medzi najčastejšie používané analyzátory patria ESI-qTOF (ionizácia elektrosprejom v kombinácii s kvadrupólovým detektorom doby letu), ESI-IT (ionizácia elektrosprejom v kombinácii s iónovou pascou) alebo MALDI-TOF (ionizácia laserom za prítomnosti matrice v kombinácii s detektorom doby letu) zamerané na kvalitatívne stanovenie, ďalej trojité kvadrupólové a IT systémy zamerané na kvantitatívne stanovenie. Hlavnou výhodou MS je vysoká priepustnosť a multiplexovanie [45].

MS je neimunologická metóda, kedy je analyzovaný proteín, teda alergén alebo jeho časť. Táto metóda môže byť presná na objavenie alergénov alebo epitopu kódovaného v proteínových skupinách. Nevýhodou je, že vyžaduje drahú inštrumentáciu, komplexnú prevádzku a následnú podrobnú analýzu dát, ktorá je časovo náročná a nákladná. V súčasnosti sa však vyžaduje rýchla detekcia a preto táto metóda nie je z časového hľadiska vyhovujúca pre rutinné analýzy [52].

3. ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo zhrnúť na základe dostupnej literatúry poznatky nielen o možnostiach diagnostiky potravinovej alergie, ale aj metódy umožňujúce stanovenie alergénov priamo v potravinách. Pre základné pochopenie boli v práci uvedené teoretické základy a najdôležitejšie alergény.

Pri diagnostike potravinovej alergie majú veľký význam kožné prick testy a stanovenie špecifického IgE, ktoré dokážu určiť reálnu potravinovú alergiu. K tomuto účelu sa využívajú tiež aj kožné náplast'ové testy a expozičné testy. Z detekčných metód sú najpoužívanejšie ELISA, ktorá označuje molekuly na detekciu a radí sa k citlivým metódam. Ďalšími bežnými metódami bez veľkých zariadení sú metódy na báze DNA, kde patrí aj polymerázová reťazová reakcia, ktorá je vysoko špecifická a používa sa na monitorovanie alergénov počas spracovania potravín a umožňuje aj detekciu viacerých druhov kôrovcov. Ďalšou sľubnou technikou na detekciu alergénov je povrchová plazmónová rezonancia, ktorá je výhodná pri detekcii alergénov mlieka a nepoužíva označenie molekúl na detekciu. Modernejšie špičkové zariadenia predstavujú biosenzory, ktoré poskytujú semikvantitatívne alebo kvantitatívne údaje na základe elektrochemického snímača a to ako v surových, tak aj v spracovaných potravinách. Nová POC technológia, ktorá v svojich stanoveniach využíva moderné platformy s inteligentným telefónom dokáže detekovať monovrstvové a dvojvrstvové proteíny do hrúbky troch nanometrov. Hmotnostná spektrometria vďaka novej generácii hmotnostných analyzátorov je schopná stanoviť alergény kvalitatívne aj kvantitatívne, avšak z časového hľadiska nie je moc výhodná pre rutinné analýzy. Ako výhodnejšia sa javí vysokoúčinná kvapalinová chromatografia spojená s metódou tandemovej hmotnostnej spektrometrie, ktorá je citlivá a využiteľná najmä pri stanovení viacerých alergénov súčasne. Zo všetkých uvedených metód v tejto bakalárskej práci vyplýva, že súčasná doba poskytuje vysoko citlivé a špecifické metódy na stanovenie alergénov v širokom spektre zdrojov potravy.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. ISBN 80-862-2550-X.
- [2] *Primárny kontakt* [online]. Nové Zámky: Health Strategies, 2014, 2(01), 42 s. [cit. 2019-06-27]. ISSN 1339-5009. Dostupné z: <http://www.primarnykontakt.sk/casopis/pk201404.pdf>
- [3] GÓMEZ-ARRIBAS, L., BENITO-PEÑA, E., HURTADO-SÁNCHEZ, M., MORENO-BONDI, M. Biosensing Based on Nanoparticles for Food Allergens Detection. *Sensors* **18**(4), 2018, DOI: 10.3390/s18041087.
- [4] VERHOECKX, K., VISSERS, Y., BAUMERT, J., et al. Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology* **80**, 2015, 223-240, DOI: 10.1016/j.fct.2015.03.005.
- [5] BURKS, A., WESLEY, H., SAMPSON, A., PLAUT, M., LACK, G., AKDIS, C.A. Treatment for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **141**(1), 2018, 1-9, DOI: 10.1016/j.jaci.2017.11.004.
- [6] VALENTA, R., HOCHWALLNER, H., LINHART, B., PAHR, S. Food Allergies: The Basics. *Gastroenterology* **148**(6), 2015, 1120-11314 DOI: 10.1053/j.gastro.2015.02.006.
- [7] SAMPSON, H.A., O'MAHONY, L., BURKS, A.W., PLAUT, M., LACK, G., AKDIS, C.A. Mechanisms of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **141**(1), 2018, 11-19, DOI: 10.1016/j.jaci.2017.11.005.
- [8] GALLAND, L., GALLAND, J. *Jak překonat alergie* [online]. Praha: Beta, 2017 [cit. 2019-06-27]. ISBN 978-80-7306-909-4.
- [9] KIM, S.Y., KIM, M.H., CHO, Y.J. Different clinical features of anaphylaxis according to cause and risk factors for severe reactions. *Allergology International* **67**(1), 2018, 96-102, DOI: 10.1016/j.alit.2017.05.005.
- [10] FUCHS, M. *Potravinová alergie a intolerance*. Praha: Mladá fronta, 2016. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3757-0.
- [11] ROBERT, M.C.. Food Allergens: Seafood, Tree Nuts, Peanuts. *Encyclopedia of Food Chemistry*, Elsevier, 2019, s. 640-647, DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21796-4.
- [12] SOON, J.M. Food allergen knowledge, attitude and practices among UK consumers: A structural modelling approach. *Food Research International* **120**, 2019, 375-381, DOI: 10.1016/j.foodres.2019.03.008.
- [13] Vyhláška č. 243/2015 Z. z.: o požiadavkách na označovanie potravín. In: *Zbierka zákonov Slovenskej Republiky* [online]. Slovensko, b.r. [cit. 2019-05-04].
- [14] The 14 main food allergens are listed below. In: *Manor house pre-school* [online]. Clowns Nursery Group, b.r. [cit. 2019-05-11]. Dostupné z: <https://www.clownsnursery.co.uk/food-allergens/>
- [15] MÜLLER-BURZLER, H. *Alergie: rozpoznávání a léčení alergického syndromu - dermatitida, astma, senná rýma, hyperaktivita*. Hodkovičky [Praha]: Pragma, 2007. ISBN 978-80-7205-973-7.

- [16] CIANFERONI, A., SPERGEL, J. Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis. *Allergology International* **58**(4), 2009, 457-466, DOI: 10.2332/allergolint.09-RAI-0138.
- [17] TURNBULL, J., ADAMS, H., GORARD, D. *Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances* **41**(1), 2015, 3-25, DOI: 10.1111/apt.12984.
- [18] SARINHO, E., LINS, M. Severe forms of food allergy. *Jornal de Pediatria* **93**, 2017, 53-59, DOI: 10.1016/j.jped.2017.06.021.
- [19] BRIETZKE, E., CERQUEIRA, R., MANSUR, R., MCINTYRE, R. Gluten related illnesses and severe mental disorders: a comprehensive review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **84**, 2018, 368-375, DOI: 10.1016/j.neubiorev.2017.08.009.
- [20] BUTTERWORTH, J., LOS, L. Coeliac disease. *Medicine* **47**(5), 2019, 314-319, DOI: 10.1016/j.mpmed.2019.02.003.
- [21] SCHERF, K. Immunoreactive cereal proteins in wheat allergy, non-celiac gluten/wheat sensitivity (NCGS) and celiac disease. *Current Opinion in Food Science* **25**, 2019, 35-41, DOI: 10.1016/j.cofs.2019.02.003.
- [22] REFAAT, M., EL-DAMHOUGY, K., SADIQ, A., ATTIA, M., MABROUK, M. Desensitization by Sublingual Immunotherapy for Crustacean Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **131**(2), 2013, DOI: 10.1016/j.jaci.2012.12.981.
- [23] BARRE, A., SIMPLICIEN, M., CASSAN, G., BENOIST, H., ROUGÉ, P. Food allergen families common to different arthropods (mites, insects, crustaceans), mollusks and nematods: Cross-reactivity and potential cross-allergenicity. *Revue Française d'Allergologie* **58**(8), 2018, 581-593, DOI: 10.1016/j.reval.2018.10.008
- [24] RUETHERS, T., TAKI, AC., JOHNSTON, EB., et al. Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens. *Molecular Immunology* **100**, 2018, 28-57, DOI: 10.1016/j.molimm.2018.04.008.
- [25] ZHU, Y., VANGA, SK., WANG, J., RAGHAVAN, V. Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white. *Trends in Food Science & Technology* **78**, 2018, 188-196, DOI: 10.1016/j.tifs.2018.06.005.
- [26] SICHERER, S., WOOD, R., VICKERY, B., et al. The natural history of egg allergy in an observational cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **133**(2), 2014, 492-4998, DOI: 10.1016/j.jaci.2013.12.1041.
- [27] SAVAGE, J., MATSUI, E., SKRIPAK, J., WOOD, R. The natural history of egg allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**(6), 2007, 1413-1417, DOI: 10.1016/j.jaci.2007.09.040.
- [28] KALIC, T., MOREL-CODREANU, F., RADAUER CH., et al. Patients Allergic to Fish Tolerate Ray Based on the Low Allergenicity of Its Parvalbumin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* **7**(2), 2019, DOI: 10.1016/j.jaip.2018.11.011.
- [29] PALLADINO, CH., BREITENEDER, H. Peanut allergens. *Molecular Immunology* **100**, 2018, 58-70, DOI: 10.1016/j.molimm.2018.04.005.
- [30] MINDELL, E. *Alergie: léčba a odstranění příčin alergických reakcí*. Praha: Dobrovský, 2017. Kniha Omega. ISBN ISBN978-80-7390-412-8.

- [31] JAYASENA, S., KOPPELMAN, S., NAYAK, B., TAYLOR, S., BAUMERT, J. Comparison of recovery and immunochemical detection of peanut proteins from differentially roasted peanut flour using ELISA. *Food Chemistry* **292**, 2019, 32-38, DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.04.026.
- [32] Allergen Nomenclature. *Allergen Nomenclature WHO/TUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee* [online]. b.r. [cit. 2019-05-07]. Dostupné z: <http://www.allergen.org/search.php?allergenname=&allergensource=Arachis+hypogaea&TaxSource=&TaxOrder=&foodallerg=all&bioname=>
- [33] OYEDEJI, A., MELLEM, J., IJABADENIYI, O. Potential for enhanced soy storage protein breakdown and allergen reduction in soy-based foods produced with optimized sprouted soybeans. *LWT* **98**, 2018, 540-545, DOI: 10.1016/j.lwt.2018.09.019.
- [34] D'AURIA, E., MAMELI, CH., PIRAS, C., COCCIONI, L., URBANI, A., ZUCCOTTI, G.V., RONCADA, P. Precision medicine in cow's milk allergy: proteomics perspectives from allergens to patients. *Journal of Proteomics* **188**, 2018, 173-180, DOI: 10.1016/j.jprot.2018.01.018.
- [35] PECORA, V., VALLUZZI, R., MENNINI, M., FIERRO, V., DAHDAH, L. Debates in Allergy Medicine: Does oral immunotherapy shorten the duration of milk and egg allergy? The pro argument. *World Allergy Organization Journal* **11**, 2018, DOI: 10.1186/s40413-018-0191-6.
- [36] LOH, W., L.K. TANG, M. Debates in Allergy Medicine: Oral immunotherapy shortens the duration of milk and egg allergy - the con argument. *World Allergy Organization Journal* **11**, 2018, DOI: 10.1186/s40413-018-0189-0.
- [37] GEISELHART, S., HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K., BUBLIN, M. Tree nut allergens. *Molecular Immunology* **100**, 2018, 71-81, DOI: 10.1016/j.molimm.2018.03.011.
- [38] ROS, E. Eat Nuts, Live Longer. *Journal of the American College of Cardiology* **70**(20), 2017, 2533-2535, DOI: 10.1016/j.jacc.2017.09.1082.
- [39] POSADA-AYALA, M., ALVAREZ-LLAMAS, G., S. MAROTO, A., et al. Novel liquid chromatography–mass spectrometry method for sensitive determination of the mustard allergen Sin a 1 in food. *Food Chemistry* **183**, 2015, DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.02.139.
- [40] BEYER, K., BARDINA, L., GRISHINA, G., A. SAMPSON, H. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: Seed storage proteins as common food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **110**(1), 2002, 154-159, DOI: 10.1067/mai.2002.125487.
- [41] MIKROPOULOU, EV., A. PETRAKIS, E., ARGYROPOULOU, A., MITAKOU, S., HALABALAKI, M., A. SKALTSOUNIS, L. Quantification of bioactive lignans in sesame seeds using HPTLC densitometry: Comparative evaluation by HPLC-PDA. *Food Chemistry* **288**, 2019, 1-7, DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.02.109.
- [42] *Sulfite Sensitivity* [online]. b.r. [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://www.allergy.org.au/patients/product-allergy/sulfite-allergy>
- [43] JIMENEZ-LOPEZ, J., C. FOLEY, R., BREAR, E., et al. Characterization of narrow-leaf lupin (*Lupinus angustifolius* L.) recombinant major allergen IgE-binding proteins

- and the natural β -conglutin counterparts in sweet lupin seed species. *Food Chemistry* **244**, 2018, 60-70, DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.015.
- [44] BINGEMANN, T., B. SANTOS, C., F. RUSSELL, A., ANAGNOSTOU, A. Lupin. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **122**(1), 2019, 8-10, DOI: 10.1016/j.anai.2018.09.467.
- [45] MONACI, L., DE ANGELIS, E., MONTEMURRO, N., PILOLLI, R. Comprehensive overview and recent advances in proteomics MS based methods for food allergens analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **106**, 2018, 21-36, DOI: 10.1016/j.trac.2018.06.016.
- [46] KNIGHT, V., WOLF, M.L., TRIKHA, A., CURRAN-EVERETT, D., HISEROTE, M., HARBECK, R.J. A comparison of specific IgE and skin prick test results to common environmental allergens using the HYTEC™ 288. *Journal of Immunological Methods* **462**, 2018, 9-12, DOI: 10.1016/j.jim.2018.07.005.
- [47] In: *BIOTECK PHARM S.A.L.* [online]. b.r. [cit. 2019-06-18]. Dostupné z: <https://www.fmpsholding.com/841/Product>
- [48] MOTHESS-LUKSCH, N., JORDAKIEVA, G., HINTERHÖLZL, L., JENSEN, A.N., HALLMANN, P.K., KUNDI, M., JAROLIM, E.J. Allergy diagnosis from symptoms to molecules, or from molecules to symptoms: a comparative clinical study. *World Allergy Organization Journal* **11**, 2018, DOI: 10.1186/s40413-018-0199-y.
- [49] BROEKMAN, H.C.H., EIWEGGER, T., UPTON, J., BØGH, K.L. IgE – the main player of food allergy. *Drug Discovery Today: Disease Models* **17-18**, 2015, 37-44, DOI: 10.1016/j.ddmod.2016.07.001.
- [50] *Alergie: Časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii* [online]. Praha: Tigris, 2018, **2018**(20) [cit. 2019-06-18]. ISSN 1212-3536. Dostupné z: https://www.csaki.cz/dokumenty/Doporucene_postupy_expo_testu_s_potravinyami.pdf
- [51] SOUZA LIMA, I., AARESTRUP, B.J., SOUZA LIMA, E.M., SOUZA LIMA, M.C., SOUZA LIMA, E.C., AARESTRUP, F.M. Brazilian experience with atopy patch tests for *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* and *Blomia tropicalis*. *World Allergy Organization Journal* **11**, 2018, DOI: 10.1186/s40413-018-0206-3.
- [52] ZHANG, M., WU, P., WU, J., PING, J., WU, J. Advanced DNA-based methods for the detection of peanut allergens in processed food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **114**, 2019, 278-292, DOI: 10.1016/j.trac.2019.01.021.
- [53] WU, L., LI, G., XU, X., ZHU, L., HUANG, R., CHEN, X. Application of nano-ELISA in food analysis: Recent advances and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **113**, 2019, 140-156, DOI: 10.1016/j.trac.2019.02.002.
- [54] Virtuálne laboratórium molekulárnej biológie. In: *Virtuálne laboratórium molekulárnej biológie* [online]. Nitra, b.r. [cit. 2019-06-14]. Dostupné z: <http://www.kbg.fpv.ukf.sk/LMB/VLMB/index.html>
- [55] ORCAJO, J., LAVILLA, M., MARTÍNEZ-DE-MARAÑÓN, I. Specific and sensitive ELISA for measurement of IgE-binding variations of milk allergen β -lactoglobulin in processed foods. *Analytica Chimica Acta* **1052**, 2019, DOI: 10.1016/j.aca.2018.11.048.
- [56] ZHOU, J., QI, Q., WANG, CH., QIAN, Y., LIU, G., WANG, Y., FU, L. Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, DOI: 10.1016/j.bios.2019.111449.
- [57] ZAGON, J., SCHMIDT, J., SCHMIDT, A.S., BROLL, H., LAMPEN, A., SEIDLER, T., BRAEUNING, A. A novel screening approach based on six real-time PCR systems

- for the detection of crustacean species in food. *Food Control* **79**, 2017, 27-34, DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.03.019.
- [58] NEETHIRAJAN, S., WENG, X., TAH, A., CORDERO, J.O., RAGAVAN, K.V. Nano-biosensor platforms for detecting food allergens – New trends. *Sensing and Bio-Sensing Research* **18**, 2018, 13-30, DOI: 10.1016/j.sbsr.2018.02.005.
- [59] HOSU, O., SELVOLINI, G., MARRAZZA, G. Recent advances of immunosensors for detecting food allergens. *Current Opinion in Electrochemistry* **10**, 2018, 149-156, DOI: 10.1016/j.coelec.2018.05.022. ISSN 24519103.
- [60] ANGULO, A., ELETXIGERRA, U., LASHERAS, X., CAMPUZANO, S., MERINO, S. Electrochemical tropomyosin allergen immunosensor for complex food matrix analysis. *Analytica Chimica Acta*, 2019, DOI: 10.1016/j.aca.2019.06.030.
- [61] GOMAA, A., BOYE, J. Impact of irradiation and thermal processing on the immunochemical detection of milk and egg allergens in foods. *Food Research International* **74**, 2015, 275-283, DOI: 10.1016/j.foodres.2015.05.023.
- [62] SUN, L., LIN, H., LI, Z., et al. Development of a method for the quantification of fish major allergen parvalbumin in food matrix via liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Food Chemistry* **276**, 2019, 358-365, DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.10.014.
- [63] HEICK, J., FISCHER, M., PÖPPING, B. First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography* **1218**(7), 2011, 938-943, DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.067.
- [64] QI, K., LIU, T., YANG, Y., ZHANG, J., YIN, J., DING, X., QIN, W., YANG, Y. A rapid immobilized trypsin digestion combined with liquid chromatography – Tandem mass spectrometry for the detection of milk allergens in baked food. *Food Control* **102**, 2019, 179-187, DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.03.017.