

Određivanje glutena u prehrambenim proizvodima imunoenzimskom (ELISA) metodom

Oršulić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:230813>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Katarina Oršulić

**Određivanje glutena u prehrambenim
proizvodima imunoenzimskom (ELISA)
metodom**

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2020. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Bošnjir, dipl. san. ing. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.

Zahvale

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Bošnjir, dipl. san. ing., koja mi je omogućila rad na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ te svim ostalim djelatnicima Zavoda na stručnim savjetima, uputama i smjernicama koje su pomogle prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i svojoj mentorici na Fakultetu, prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić, na prenesenom znanju i pomoći tijekom diplomskog studija.

Za kraj, najviše od svega želim zahvaliti svojim roditeljima koji su mi omogućili bezbrižno školovanje te prijateljima i kolegama koji su bili uz mene i na koje sam se mogla osloniti u svakom trenutku.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Alergeni u hrani	2
2.2. Gluten.....	2
2.2.1. <i>Kemijska struktura glutena</i>	<i>4</i>
2.3. Poremećaji zdravlja izazvani glutenom.....	7
2.3.1. <i>Celijakija.....</i>	<i>8</i>
2.3.2. <i>Glutenska ataksija.....</i>	<i>11</i>
2.3.3. <i>Dermatitis herpetiformis</i>	<i>11</i>
2.3.4. <i>Alergija na pšenicu</i>	<i>12</i>
2.3.5. <i>Preosjetljivost na gluten.....</i>	<i>13</i>
2.4. Bezglutenska prehrana	14
2.5. Metoda ELISA	18
2.6. Validacija.....	20
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. Materijali	22
3.1.1. <i>Uzorci</i>	<i>22</i>
3.1.2. <i>Kemikalije</i>	<i>23</i>
3.1.3. <i>Laboratorijska oprema i pribor</i>	<i>25</i>
3.2. Postupak analize glutena	25
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Validacija metode.....	30
4.1.1. <i>Preciznost.....</i>	<i>30</i>
b) <i>Ponovljivost mjerenja masene koncentracije standarda</i>	<i>31</i>
c) <i>Međupreciznost.....</i>	<i>32</i>
4.1.2. <i>Točnost metode</i>	<i>32</i>
4.1.3. <i>Granica kvantifikacije.....</i>	<i>34</i>
4.2. Određivanje udjela glutena metodom ELISA.....	35
§ 5. ZAKLJUČAK	37
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	38

§ 7. LITERATURNI IZVORI..... 39



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Određivanje glutena u prehrambenim proizvodima imunoenzimskom (ELISA) metodom

Katarina Oršulić

Gluten je tvar koja se nalazi u žitaricama, a sastoji se od dva glavna proteina, glutenina i glijadina koji mogu izazivati imunološke reakcije kod pojedinaca. Pri liječenju osjetljivosti na gluten bezglutenskom prehranom dolazi do problema zbog namjerne ili nenamjerne kontaminacije različitih prehrambenih proizvoda glutenom.

Analizu glutena u različitim prehrambenim proizvodima provedena je imunoenzimskom (ELISA) metodom. Od ukupno 30 analiziranih proizvoda, dva uzorka piva sadržavali su masenu koncentraciju glutena veću od 100 mg/kg te se svrstavaju u proizvode s glutenom, dva su uzorka piva s udjelom glutena između 20 i 100 mg/kg (proizvodi s vrlo niskim sadržajem glutena), dok su ostali uzorci sadržavali masenu koncentraciju glutena manju od 20 mg/kg i smatraju se bezglutenski. Metoda je validirana, a svi se parametri validacije nalaze unutar statistički prihvatljivih granica prihvatljivosti, dobiveni rezultati metode mogu se smatrati pouzdanim i preciznim te je metoda prihvatljiva za rutinsku analizu. Sve vrijednosti masenih koncentracija uzorka glutena imaju RSD (%) manji od 1,46 te se nalaze unutar granica prihvatljivosti metode.

(40 stranica, 18 slika, 10 tablica, 43 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: bezglutenska prehrana, ELISA, glijadin, gluten, glutenin, prolamin

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Bošnjir, dipl. san. ing.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 2. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović
 3. prof. dr. sc. Ines Primožič
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 30. rujna 2020.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Determination of gluten in food products using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Katarina Oršulić

Gluten is an elastic protein substance found in cereals. It consists of two main proteins, glutenin and gliadin, which can cause immune reactions. The main treatment for gluten-sensitive individuals is a gluten-free diet which might be problematic due to intentional or unintentional contamination of food products with gluten.

The immunoenzyme (ELISA) method is validated, and all validation parameters are within statistically acceptable limits of acceptability. Results of the method can be considered reliable and the method is acceptable for routine analysis. All values of the mass concentrations of the gluten samples have a RSD (%) less than 1,46 and are within the acceptability limits of the method. Analysis of gluten in various food products was performed by ELISA method and 30 products were analyzed. Two samples contained a mass content of gluten greater than 100 mg/kg and are classified as products with gluten, two samples with a gluten content between 20 and 100 mg/kg (products with very low gluten content), while other samples contained a gluten mass content of less than 20 mg/kg and are considered as gluten-free.

(40 pages, 18 figures, 10 tables, 43 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: ELISA, gliadin, gluten, gluten – free diet, glutenin, prolamine

Mentor: Dr. Jasna Bošnjir, Professor

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
2. Dr. Ivica Đilović, Associate Professor
3. Dr. Ines Primožič, Professor

Substitute: Dr. Andriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: 30th September 2020.

§ 1. UVOD

Gluten je elastična, bjelančevinasta tvar koja se nalazi u pšenici, ječmu, raži, piru i zobi. Sastoji se od dva glavna proteina, glutenina i glijadina. Gluten je poznat kao alergena tvar jer se kod pojedinih ljudi javlja prirođena sklonost nepodnošenja glutena. Budući da su žitarice među najvažnijim prehrambenim kulturama, od osobite važnosti je istraživanje glutena i razvoj metoda njegove detekcije u različitim prehrambenim proizvodima.¹

Zbog sve veće spoznaje o alergijskim učincima glutena, na tržištu je sve više proizvoda s oznakom „bez glutena“ ili „sa smanjenim sadržajem glutena“. Uklanjanje glutena iz žitarica koje sadrže gluten je složen proces u kojem može doći do različitih tehnoloških poteškoća. Upravo zbog toga, ali i zbog ekonomskih troškova, vrlo je teško proizvesti hranu sasvim bez glutena. Velik problem predstavlja kontaminacija zobi i drugih žitarica bez glutena pšenicom, raži ili ječmom, koji sadrže gluten, za vrijeme žetve, prijevoza, skladištenja ili prerade, čime se glutenom zagađuju i krajnji proizvodi. Upravo zbog toga postoji potreba za razvoj metoda za otkrivanje alergena i nužno je poboljšati označavanje prehrambenih proizvoda kako bi se zaštitili krajnji potrošači.⁵

Cilj ovog diplomskog rada istražiti je udio glutena u prehrambenim proizvodima na tržištu za koje se zna da sadrže, odnosno ne sadrže gluten, te utvrditi moguće nepravilnosti kod proizvoda koji imaju oznaku „bez glutena“ i „sa smanjenim sadržajem glutena“.

Udio glutena u hrani analizirat će se analitičkom imunoenzimskom ELISA metodom (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), prema Normi HRN EN ISO/IEC 17025, za koju je Laboratorij akreditiran od Hrvatske akreditacijske agencije. Za određivanje masene koncentracije glutena u različitim prehrambenim proizvodima imunoenzimskom metodom ELISA, metoda će se prethodno validirati. Na temelju rezultata analize prehrambeni proizvodi podijelit će se na bezglutenske (s masenom koncentracijom glutena manjom od 20 mg/kg prema Uredbi (EU) br. 828/2014 o zahtjevima za informiranje potrošača o odsutnosti ili smanjenoj prisutnosti glutena u hrani) te proizvode koji sadrže manji i veći udio glutena.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Alergeni u hrani

Alergija na hranu, poznata i kao preosjetljivost na hranu, javlja se zbog reakcije imunološkog sustava na inače bezopasne proteine u hrani tzv. alergene.² Glavni prehrambeni alergeni su glikoproteini topljivi u vodi, mase 10 do 70 kDa, koji su relativno stabilni na razgradnju djelovanjem topline, kiselina ili proteaza.³

Najčešći alergeni su proteini u jajima, mlijeku, orašastim plodovima, kikirikiju, soji, pšenici, ribama i školjkama, ali kod nekih ljudi, preosjetljivost mogu izazvati i alergeni koji se nalaze u voću, povrću ili sjemenkama. Alergije na hranu najčešće su povezane s imunološkim poremećajima imunoglobulina E (IgE) koji nastaju nakon izlaganja alergenoj hrani. Alergije se različito manifestiraju, od blagog svrbeža, gastrointestinalnih simptoma do životno prijetećeg anafilaktičkog šoka.⁵ Osobe koje imaju alergijske reakcije obično potpuno izbjegavaju hranu na koju su osjetljive.⁴

Problem u javnom zdravstvu predstavlja sve više alergija na hranu. Uočeno je da su alergije češće u razvijenim zemljama, a pretpostavlja se da je razlog tome što je u tim zemljama ljudski imunološki sustav manje izložen uzročnicima infekcija i ne treba prepoznati i boriti se protiv infekcija.² Utjecaj na učestalost alergija imaju i promjene prehrambenih navika, način pripreme hrane te složen sastav prehrambenih proizvoda.⁴

Različite metode prerade hrane također utječu na učestalost alergija jer tijekom prerade može doći do kemijske ili konformacijske promjene specifičnih proteina čime se može povećati ili smanjiti njihova alergenost. Kod voća i povrća stupanj zrelosti može znatno utjecati na alergenost proteina koje sadrže.²

2.2. Gluten

Gluten je po svojim svojstvima ljepljiva, elastična bjelančevinasta tvar, kompleks kojeg čine stotine različitih proteina, među kojima su najvažniji gliadin i glutenin. Biološka uloga glutena je skladištenje ugljika, dušika i sumpora, što je potrebno za klijanje sjemena i rast biljke. Nije poznata druga biološka uloga glutena, a izuzetno elastična se svojstva smatraju posljedicom strukture i interakcija građevnih proteina glutena.⁷

Zajednički naziv za proteine glijadin i glutenin je prolamin, sadrže visoki udio glutaminskih (38%) i prolinskih (20%) ostataka, netopljivi su u vodi, a ekstrahiraju se etanolom.¹

Općenito, glutenski proteini mogu se razvrstati u različite podskupine prema njihovim različitim svojstvima, kao što su primjerice različit udio sumpora ili molekulska masa, različita struktura pa tako postoje α , β , γ i ω glijadini. Pojedinačni glutenski proteini povezani su kovalentnom vezom i različitim nekovalentnim interakcijama koje doprinose jedinstvenim svojstvima glutena.¹

Gluten je glavni sastojak pšenice, jedne od najvažnijih svjetskih prehrambenih kultura koja se uzgaja, konzumira i kojom se trguje širom svijeta. Zrno pšenice sadrži 8% -15% proteina, od čega je 10% -15% albumin/globulin, a 85% -90% čini gluten. Neke žitarice sadrže glutenu slične proteine, koji se nazivaju glutenom, primjerice u ječmu je hordein, u raži sekalin, a avenin u zobi. Neke žitarice kao što su pir i kamut sadrže i gluten i glutenom.^{1,6}

Sadržaj proteina u glutenu može se razlikovati zbog uvjeta uzgoja i korištenih tehnoloških procesa prilikom obrade. Primjerice, α -glijadini prisutni u zrnju pšenice mogu se ukloniti tehnološkim procesom, odnosno djelovanjem valjka. Sadržaj ω -5 glijadina u glutenu raste s gnojdbom prilikom uzgoja pšenice, a na njegov sadržaj se može utjecati i promjenom temperature.¹

Gluten je termički stabilan, koristi se kao vezivno sredstvo, punilo i dodatak prerađenoj hrani za poboljšanje teksture, zadržavanje vlage i poboljšanje okusa. Gluten se u svijetu najviše koristi za kruh i tjesteninu, u kolačima, pecivima, keksima i ostalim pekarskim proizvodima, može se pronaći i u drugim prehrambenim proizvodima kao što su prerađeno meso, vegeterijanske zamjene mesa, morska hrana itd. Gluten se može pronaći i kao zgušnjivač, emulgator ili sredstvo za geliranje u sladoledu, bombonima, začinima, maslacu, marinadama i preljevima. U lijekovima i prehrambenim proizvodima dobivenim obradom ugljikohidratnih sirovina uz različite dodatke, gluten se koristi kao punilo ili prevlaka.¹

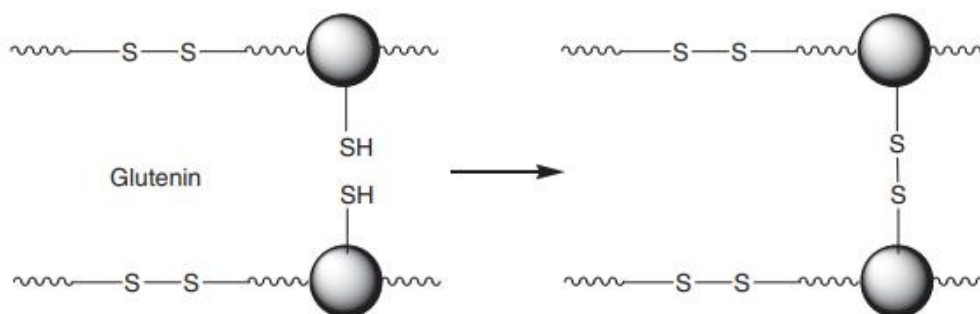
Funkcionalnost glutena uvelike ovisi o omjeru i interakciji molekula glijadina i glutenina, pa tako primjerice hidratizirane molekule glijadina doprinose viskoznosti, a hidratizirane kohezivne molekule glutenina doprinose čvrstoći i elastičnosti krajnjeg proizvoda.¹ Kohezivnost i elastičnost proizvoda prikazane su na Slici 1.



Slika 1. Prikaz rastegnutog glutena na kojem se mogu primjetiti njegova kohezijska i elastična svojstva.⁷

2.2.1. *Kemijska struktura glutena*

Glijadini i glutenini glavni su proteini koji čine kompleks glutena. Većina glijadina su monomeri izgrađeni od polipeptida molekulske mase 3000 do 6000. Polipeptidi su međusobno povezani preko cisteinskih ostataka koji tvore disulfidne veze (Slika 2).⁸



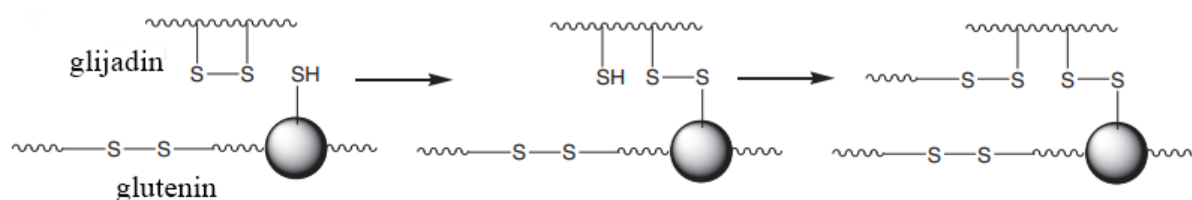
Slika 2. Prikaz povezivanja lanaca glutenina pomoću disulfidnih veza (preuzeto i prilagođeno prema ref 8).⁸

Prvotno su glijadini, ovisno o pokretljivosti pri niskom pH u gel elektroforezi, bili podijeljeni na α -, β -, γ - i ω -glijadine. Daljnjim istraživanjima glijadina uočene su male razlike u aminokiselinskim slijedovima te su glijadini podijeljeni u $\omega 5$ -, $\omega 1,2$ -, α/β - i γ -glijadine. ω -glijadini imaju najveći sadržaj glutamina, prolina i fenilalanina koji čine čak do 80% sastava.

ω 5-glijadini veće su molekulske mase (≈ 50000) od ω 1,2-glijadina (≈ 40000). Kod ω -glijadina može se uočiti jako malo cisteina zbog čega ne može doći do nastajanja disulfidne veze. α/β - i γ -glijadini slične su molekulske mase (28000-35000), a udjeli glutamina i prolina puno su manji nego kod ω -glijadina.^{9, 10}

Kod glutenina dolazi do povezivanja lanaca disulfidnim vezama te se tako od polipeptida stvaraju polimeri velike molekulske mase. Takvi polimeri mogu biti mase od 500000 pa sve do 10 milijuna. U prehrambenoj industriji, glutenin najviše doprinosi svojstvima tijesta u pekarstvu jer utječe na čvrstoću tijesta i na volumen kruha.^{8,10}

Cisteinske su skupine prisutne i u glijadinu i gluteninu, a razlikuju se jesu li slobodne sulfhidrilne (-SH) ili disulfidne (-S-S-) skupine. Upravo povezivanjem između navedenih skupina dolazi do vezanja glijadina i glutenina u molekulu glutena. Pri sobnoj temperaturi vodikove veze omogućuju intramolekulske i intermolekulske interakcije između proteinskih lanaca. Povećanjem temperature dolazi do narušavanja vodikove veze, a daljnje zagrijavanje dovodi do prevođenja slobodne sulfhidrilne skupine u disulfidnu čime dolazi do nastajanja kovalentne veze što dodatno pridonosi povezivanju proteinskih lanaca. Takva reakcije prikazana je na Slici 3.^{8, 10}

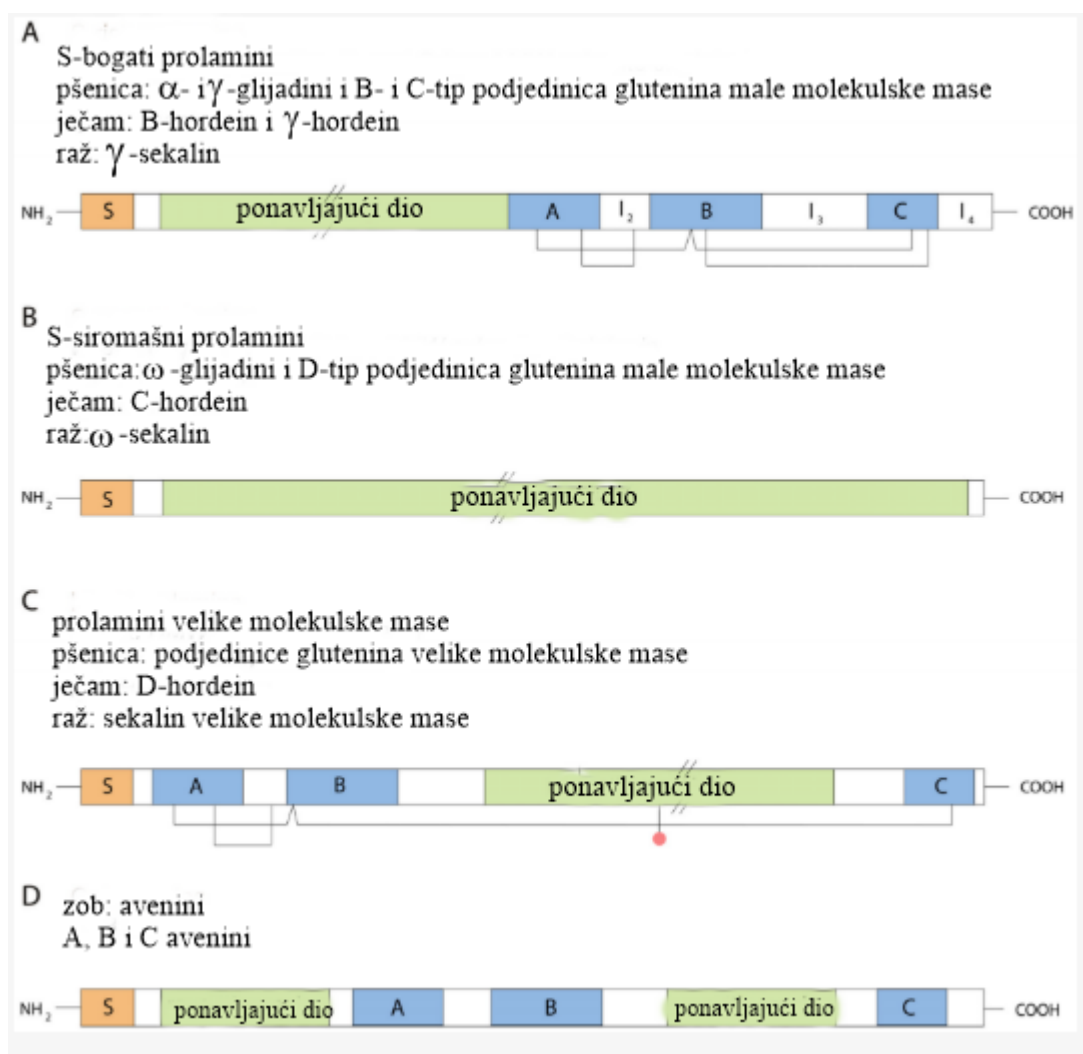


Slika 3. Prikaz reakcije između lanaca glijadina i glutenina (preuzeto i prilagođeno prema ref. 8.)⁸

U strukturi glutena postoje i druge funkcionalne skupine koje pridonose reakcijama umrežavanja s različitim reagensima te sudjeluju u različitim kemijskim modifikacijama, kao što su amino skupine jedinica arginina i lizina ili fenolne reaktivne skupine u tirozinskoj jedinici.

Prolamini, zajednički naziv za glijadine i glutenine, razlikuju se ovisno o broju i svojstvima prolaminskih polipeptida koji ih tvore. Uobičajena je podjela u tri skupine: prolamini siromašni sumporom, prolamini bogati sumporom te prolamini velike molekulske

mase. Navedeni prolamini, zajedno s prolaminima zobi, kukuruza i riže, čine prolaminsku “superobitelj”. Proteini i polipeptidi unutar takvih skupina imaju sličnu strukturu. Strukturu prolamina čini signalni peptid za translokaciju u stanične dijelove, N-terminalni dio koji se ne ponavlja, C-terminalni dio koji se ne ponavlja te dugački središnji dio koji se ponavlja. Takva struktura prikazana je na Slici 4.



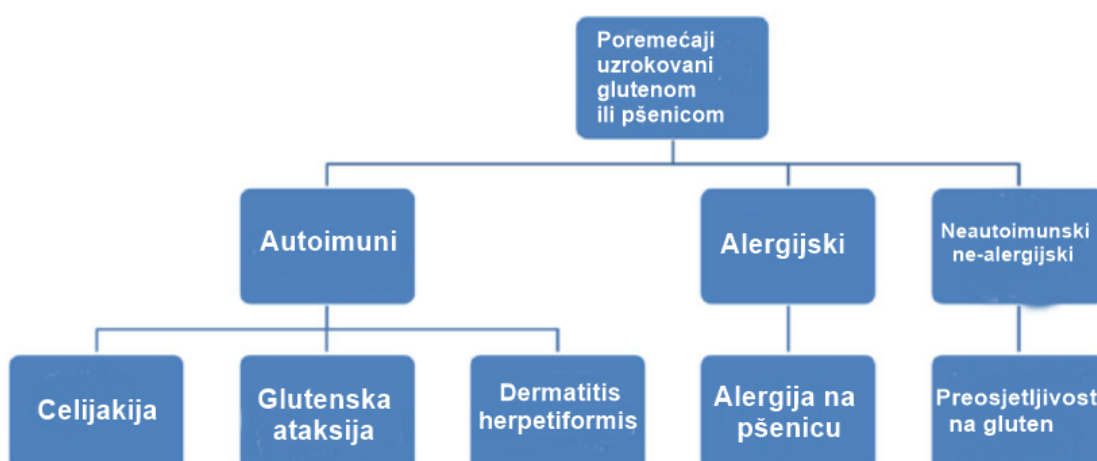
Slika 4. Struktura prolamina sa prikazom N- i C-terminalnim dijelovima koji se ne ponavljaju te dugačkim središnjim dijelom prolamina koji se ponavljaju (preuzeto i prilagođeno prema ref. 10.).¹⁰

Središnji dio strukture su ponavljajuće jedinice specifične za svaku skupinu prolamina, bogate glutaminom i prolinom. Uočena je povezanost između motiva u središnjem dijelu prolamina bogatih sumporom i prolamina siromašnim sumporom. Također, cisteinski položaji

u prolaminima visoke molekulske mase i prolaminima bogatim sumporom ostali su očuvani. Sve navedeno o prolaminu dokaz je da skupine prolamina imaju zajedničko evolucijsko podrijetlo.¹⁰

2.3. Poremećaji zdravlja izazvani glutenom

Gluten se kod pojedinaca povezuje sa različitim zdravstvenim tegobama kao što su umor, migrena, debljina, autizam, gastrointestinalni problemi i slično.⁶ Poremećaji zdravlja uzrokovani glutenom mogu se podijeliti u tri skupine: autoimuni poremećaji, alergijski poremećaji te neautoimunski nealergijski. U te skupine uključene su najčešća oboljenja poput celijakije, dermatitis herpetiformisa, glutenske ataksije, alergija na pšenicu te preosjetljivost na gluten.^{10,11} Podjela poremećaja po skupinama prikazana je na Slici 5.



Slika 5. Podjela poremećaja uzrokovanih glutenom ili pšenicom (preuzeto i prilagođeno prema ref. 1.).¹

Manji udio (2 – 4 %) pšeničnih proteina su albuminski inhibitori amilaza-tripsina, djeluju kao biljni obrambeni proteini i kao takvi utječu na ljudsku preosjetljivost na gluten. Sa zdravstvenim tegobama čovjeka povezan je i aglutinin iz pšeničnih klica, protein koji veže ugljikohidrate, odnosno lektin. Taj protein štetno djeluje na epitel i imunološki sustav čime doprinosi intestinalnim i ekstraintestinalnim poteškoćama povezanim s unosom glutena.^{10, 11}

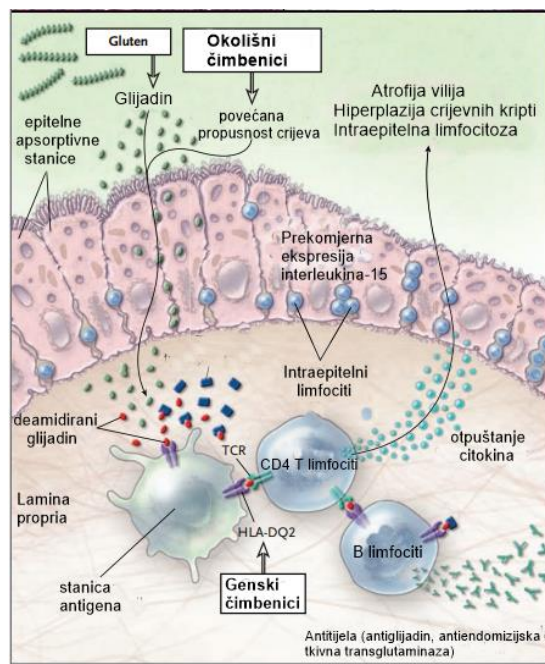
Glijadin sadrži peptidne sekvence otporne na želučanu probavu, probavu gušterače ili crijeva, pa ne dolazi do njegove razgradnje u crijevima čovjeka. Razlog otpornosti glutena prema gastrointestinalnim enzimima su prolin i glutamin, a kako ostatci prolina mogu tvoriti uske, kompaktne slagaline, glutenski peptidi na površini sluznice mogu potaknuti razvoj upalne reakcije.^{1,6}

Uočeno je da su glijadinski peptidi najtoksičniji, pogotovo oni peptidi izdvojeni iz α - i γ -glijadina, a najjači i najčešći odgovor imunološkog sustava izaziva fragment peptida od 33 aminokiseline iz α -glijadina.^{10,11}

2.3.1. Celijakija

Celijakija (engl. *Celiac disease*, CeD) je kronična autoimuna bolest koja pogađa ljude svih starosnih dobi.^{12,13} Nastaje kao rezultat imunološke reakcije na uneseni gluten, a takva reakcija događa se samo kod genski predisporiranih pojedinaca. Bolest uzrokuje glijadinski dio glutena koji dovodi do imunološke reakcije koja rezultira atrofičnom lezijom sluznice jejunuma i trajnom netolerancijom na gluten.¹⁴ Celijakija je okarakterizirana crijevnom malapsorpcijom s histološkom lezijom sluznice u gornjem dijelu tankog crijeva. Zbog malapsorpcije najčešće dolazi do nedostatka željeza, kalcija, vitamina D te do pojave anemije.

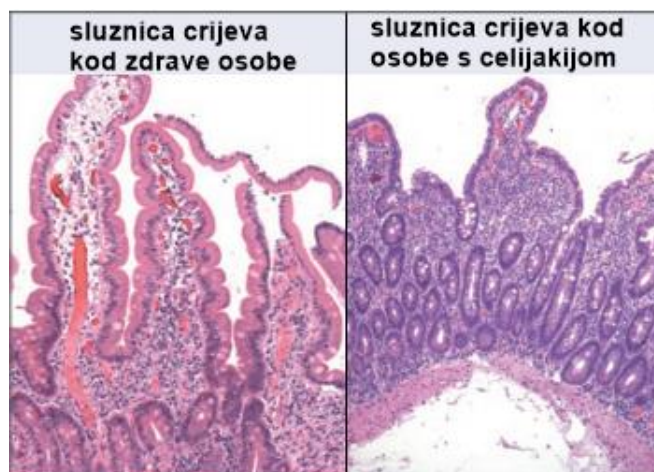
Celijakija je kompleksna i smatra se rezultatom reakcije glutena te ima više faktora, kao što su imunološki, genetski, ali i faktori okoliša. Sam mehanizam pojave celijakije počinje razgradnjom glutena probavnim enzimima na aminokiseline i peptide, te peptide glijadina koji induciraju promjene u epitelu i time aktiviraju urođeni imunološki sustav, a u lamini proprijii aktiviraju stečeni imunološki sustav. Mehanizam je slikovito prikazan na Slici 6.¹³



Slika 6. Prikaz mehanizma nastajanja celijakije (preuzeto i prilagođeno prema ref. 13.).¹³

Simptomi ove bolesti su različiti, a može doći do pojave *dermatitisa herpetiformisa*, oštećenja zubne cakline, osteoporoze, zastoja u rastu, odgođenog puberteta, trajne sideropenične kronične dijareje, trbušnih grčeva, natečenosti, umora, glavobolje i zatvora. Pacijenti s celijakijom imaju veći rizik za rak, osobito limfom B i T stanica, a često se mogu pronaći pacijenti koji uz celijakiju imaju i disfunkciju jetre te povišene jetrene enzime.^{13, 14, 15}

Testiranje na celijakiju preporuča se ukoliko netko od bliskih rođaka boluje od celijakije, ili oboljenja poput Turnerovog sindroma, Downovog sindroma ili dijabetesa tipa 1.¹³ Dijagnoza celijakije najčešće se provodi kombinacijom testova, odnosno serološkim ispitivanjima, duodenalnom biopsijom te uvidom u kliničku povijest bolesti pacijenta. Kod većine bolesnika dijagnoza se lako postavlja, za bolest je karakteristična atrofija crijevnih resica, hiperplazija kripta te povećanje infiltracije epitelnih limfocita (Slika 7).¹³



Slika 7. Prikaz sluznice crijeva kod zdravih osoba i sluznice crijeva kod osoba koje pate od celijakije (preuzeto i prilagođeno prema ref. 13).¹³

Trenutno dostupni testovi su na antiglijadinska antitijela, antitijela vezivnog tkiva, antitijela tkivne transglutaminaze te određivanje enzima odgovornih za deaminaciju glijadina u lamina propriji. Testovi za određivanje antitijela antiglijadina danas se koriste kod djece mlađih od 18 mjeseci, a u ostalim slučajevima se ne smatraju dovoljno osjetljivim i specifičnim.¹⁴ Najosjetljiviji enzimski imunološki testovi za otkrivanje celijakije s točnosti od gotovo 100% temelje se na visokospecifičnim IgA endomizijskim antitijelima u krvi. Enzim tkivne transglutaminaze (engl. *tissue transglutaminase*, tTg) je antigen endomizijskim antitijelima pa inicijalni test u serumu uključuje analizu IgA klase anti-tTg2.¹³ Osim seroloških ispitivanja, za dijagnosticiranje celijakije koristi se i biopsija tankog crijeva.¹³

Jedino poznato liječenje oboljelih od celijakije je cjeloživotna prehrana bez glutena. Eliminacija glutena iz prehrane dovodi do remisije bolesti i popravljanja sluznice tankog crijeva, a znakovi bolesti brzo nestaju.¹⁴ Velik problem kod ovakve prehrane je što pacijenti koji boluju od celijakije ne moraju izbjegavati samo kruh, rezance i slične proizvode za koje se zna da sadrže gluten nego i različite druge prerađene proizvode koji mogu biti ili kontaminirani glutenom ili je gluten dodan zbog poboljšanja svojstava.¹⁴

Klinička istraživanja su pokazala da osobe s celijakijom većinom dobro podnose zob i na taj način mogu pojačati nutritivna svojstva prehrane. Međutim, problem je zob kontaminirana glutenom tijekom uzgoja, transporta ili tijekom procesa glodanja.¹³

2.3.2. *Glutenska ataksija*

Glutenska ataksija jedan je od najčešćih neuroloških poremećaja uzrokovanih glutenom te se svrstava u idiopatske sporadične ataksije. Uočeno je da antiglijadinska antitijela (IgA i IgG klase) protiv glutenskih proteina prepoznaju antigene koji se nalaze u stanicama u ravnotežnom centru mozga. Zaključeno je da dio stanica mozga ima sličnu strukturu s dijelom proteina glutena. Ovaj poremećaj još uvijek nije dovoljno istražen, a istraživanja su usmjerena prema razvoju krvnog testa koji će isključivo dijagnosticirati glutensku ataksiju i time ju razlikovati od svih ostalih poremećaja uzrokovanih glutenom. Ova bolest može uzrokovati trajna oštećenja mozga, pa su izuzetno važni rano otkrivanje bolesti i uvođenje stroge dijeta bez glutena.^{16, 17}

2.3.3. *Dermatitis herpetiformis*

Dermatitis herpetiformis je kronična, autoimuna, polimorfna pruritična kožna bolest, koja se očituje na koži, ali i puno opasnije, na tankom crijevu. Bolesnici koji boluju od ove bolesti nemaju važna kožna membranska antitijela, ali imaju antitijela IgA (izazvana glutenom) protiv transglutaminaze (TG)2 i TG3.

Bolest se očituje kao 1-3 mm velike papule, vezikule, mali mjehurići, ogoljenja ili ožiljci koji su često hiperpigmentirani (Slika 8).



Slika 8. Najčešći oblik i područje na kojem se pojavljuje *dermatitis herpetiformis*.¹⁸

Karakteristična mjesta na kojima se pojavljuju promjene na koži su laktovi i koljena, ali i stražnjica, ramena, srednji dio leđa, vlasište te prsti i nožni prsti. Bolest se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, a ukoliko je neliječena može biti doživotna. Kao glavni tretman kod pojave ove bolesti primjenjuje se stroga, doživotna bezglutenska dijeta, a kod neliječenih bolesnika se preporučuju redovite kontrole zbog moguće malapsorpcije ili pojave limfoma. Bolest je također jako često povezana s različitim stomatološkim problemima, promjenama u tjelesnoj masi, osteoporozom, anemijom te različitim autoimunim i zloćudnim bolestima.¹⁸

2.3.4. Alergija na pšenicu

Alergija je imunološka reakcija koja se javlja nakon izlaganja specifičnoj hrani. Na pšenicu, odnosno pšenično brašno, alergični su samo pojedinci osjetljivi na taj alergen koji izaziva proizvodnju IgE specifičnog alergena B-stanica.² Dijagnoza alergije na pšenicu se postavlja nakon pojave simptoma alergije, određivanjem IgE specifičnog za pšenicu. Alergija na pšenicu obično se razvija u djetinjstvu, a uzrokuju ju glutenski proteini kao što je glijadin, ali i neglutenski proteini kao što su profilin, serpin, α -purotionin i drugi. Najvažniji proteini koji uzrokuju alergiju na pšenicu su ω -glijadini, koji uzrokuju alergiju na hranu izazvanu vježbanjem (engl. *wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis*, WDEIA). Alergija WDEIA javlja se nakon nakon konzumacije pšenice nakon koje slijedi fizička tjelovježba,^{3, 10} najčešće kod odraslih osoba,^{3, 19} obično bez ikakve prethodne alergije na pšenicu. Kliničke manifestacije alergije WDEIA uključuju svrbež, urtikariju, angioedem, kratkoću daha, disfagiju, stezanje u prsima, obilno znojenje, glavobolju, mučninu, proljev, kolike u trbuhu, zatvaranje grla i promuklost.³ Osim ove alergije postoji i klasična alergija na hranu koja utječe na probavni ili respiratorni sustav (pekarska astma i rinitis).^{3, 19, 20} Pekarska astma je respiratorna alergija jer nastaje udisanjem brašna, najčešće kod pekara i mlinara koji su svakodnevno izloženi velikim količinama brašna.^{3, 10} Osim pšeničnog brašna, alergijsku reakciju mogu prouzročiti i proteini iz brašna žitarica bez glutena te α/β -glijadini i γ -glijadini. Proteini γ -glijadin, α/β -glijadin i ω 1,2-glijadin uzrokuju alergiju WDEIA i pekarsku astmu.¹⁰

Simptomi alergije na pšenicu obično se javljaju ubrzo nakon konzumacije, a uključuju svrbež, nadimanje, osip na koži, moguća je pojava anafilaksije, pekarske astme, rinitisa, atopijskog dermatitisa, urtikarije i slično.¹ Liječenje alergije na pšenicu temelji se na izbjegavanju pšenice, no sve se više istražuje se i mogućnost liječenja imunoterapijom.³

Postoje tri tehnike u kojima se pacijentu postepeno daju sve veće količine alergena na kojeg je osjetljiv koje se proučavaju, a to su oralna imunoterapija (engl. *oral immunotherapy*, OIT), sublingvalna imunoterapija (engl. *sublingual immunotherapy*, SLIT) i epikutana imunoterapija (engl. *epicutaneous immunotherapy*, EPIT). Navedene metode su se u većini slučajeva pokazale kao dobre, ali postoji jako puno mogućih nuspojava te su zbog toga još uvijek u fazi istraživanja.³

2.3.5. Preosjetljivost na gluten

Preosjetljivost na gluten ili necelijakijaska osjetljivost na gluten (od engl. *non-celiac gluten sensitivity*, NCGS) je klinički sindrom koji ne uključuje ni alergijske ni autoimune mehanizme, nema specifičnu gensku pozadinu,²¹ a simptomi se javljaju nakon konzumacije hrane s glutenom.²²

U histologiji NCGS-a zabilježeno je povećanje intraepitelnih limfocita. Sam mehanizam NCGS-a nije poznat, ali se pretpostavlja da važnu ulogu u pojavi ima urođeni imunološki sustav, izravni citotoksični učinak glutena i glijadina, ali i razni drugi ogranizmi te druge proteinske komponente pšenice. Kao druge proteinske komponente pšenice za koje je moguće da imaju utjecaja na izazivanje ovog sindroma navode se fermentirajući oligosaharidi, disaharidi, monosaharidi i polioli prisutni u pšenici (fruktani), a koji izazivaju nespecifične gastrointestinalne simptome, osobito napuhnutost. Takvi ugljikohidrati kratkog lanca fermentiraju u debelom crijevu i dolazi do oslobađanja plinova, odnosno crijevne distenzije. Kao proteini koji također mogu utjecati na ovaj sindrom navodi se obitelj inhibitora amilaze tripsina koji su snažni pokretači urođenog imunološkog sustava receptora te mogu potaknuti oslobađanje proupalnih citokina u stanicama.²¹

Simptomi koji se javljaju su gastrointestinalne tegobe, bolovi, mučnine, anksioznost, trnjenje ruku/nogu, gubitak tjelesne težine, anemija, depresija, dermatitis, osip na koži i mnogi drugi.²³

Problem pri određivanju preosjetljivosti na gluten NCGS je nepostojanje biomarkera, zbog čega je jako teško postići jasnu dijagnozu. Upravo zbog toga, na NCGS se može posumnjati samo na kliničkim osnovama, nakon što se utvrdi da se ne radi o celijakiji ili alergiji na pšenicu. Za potvrdu bolesti je nužna serološka negativnost na anti-transglutaminaze IgA i

antitijela protiv pšenične komponente IgE i/ili odsutnost duodenalne atrofije u duodenalnoj histologiji i reakcija kože tijekom testa uboda.^{21, 23}

2.4. Bezglutenska prehrana

Ne postoji posebna metoda liječenja poremećaja na gluten već se pacijenti podvrgavaju prehrani bez glutena ili s minimalnim sadržajem glutena (engl. *gluten free diet*, GFD).^{21, 23} Pretpostavlja se da su minimalne doze glutena koje izazivaju bolest između 10 i 20-100 mg dnevno.¹⁰ Uvođenjem bezglutenske prehrane kod oboljelih dolazi do oporavka sluznice tankog crijeva, potpun oporavak može trajati i do 8 godina, a serološki testovi se mogu normalizirati unutar godine dana.²⁴ Žitarice poput riže, kukuruza, heljde i prosa te leguminoze poput kvinoje, amaranta i soje preporučuju se kao zamjena za proizvode koji sadrže gluten, a u prehranu bi trebala biti uključena prirodna hrana bez glutena kao što su meso, riba, jaja, voće i povrće. Nakon 1-2 godine preporuča se i ponovno unošenje glutena da se ispita je li osjetljivost na gluten trajno ili prijelazno stanje.²²

Prehrana potpuno bez glutena je praktički nemoguća zbog kontaminacije hrane glutenom i/ili zbog malih količina glutena prisutnog u hrani i lijekovima.¹⁰ Prema Uredbi komisije (EU) br. 828/2014, službenom listu Europske unije definiran je sastav i označavanje hrane za osobe osjetljive na gluten. Hrana iz koje je različitim procesima uklonjen gluten ne smije sadržavati više od 100 mg/kg glutena u gotovom proizvodu, dok hrana „bez glutena“ ne smije sadržavati više od 20 mg/kg glutena u gotovom proizvodu. Sukladno tome se proizvodi mogu označiti kao proizvodi s oznakom „bez glutena“ ili s oznakom „vrlo mali sadržaj glutena“. Također, u proizvodnji hrane za dojenčad zabranjeno je korištenje namirnica koja sadrži gluten i sukladno tome se zabranjuje stavljanje oznaka „bez glutena“ ili „vrlo mali sadržaj glutena“.²⁵ Proizvodi bez glutena na tržištu se mogu lako uočiti po internacionalnom znaku prekriženog klasa prikazanom na Slici 9.



Slika 9. Internacionalni znak za proizvode bez glutena.²⁷

Osobama intolerantnim na gluten preporuča se konzumiranje voća i povrća bogatog vitaminima i antioksidansima odnosno namirnice koje ne sadrže gluten. Također, u prehranu se može uvrstiti mlijeko ili mliječni proizvodi, meso, riba i biljna ulja.¹⁰

Iako je bezglutenska dijeta jedini način liječenja poremećaja izazvanih glutenom, takav način liječenja može dovesti i do različitih nuspojava. Bezglutenska dijeta smatra se neuravnoteženom prehranom zbog nedostatka kalcija, magnezija, cinka, ali i raznih drugih nutrijenata.^{10, 28} Primjerice, žitarice bez glutena sadrže puno niže količine folata.¹⁰

Detaljan popis namirnica koje bi pacijenti intolerantni na gluten trebali koristiti i izbjegavati nalazi se u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz dopuštenih, rizičnih i zabranjenih prehrambenih proizvoda za osobe s intolerancijom na gluten.²⁶

Grupa namirnica	Dopuštene	Rizične	Zabranjene
Žitarice i namirnice bogate škrobom	kukuruz; riža; proso; heljda; amaranth; brašno rogača; kvinoa; tapioka; manioka; krumpir; kesteni	čips od krumpira; instant palenta; kukuruzne pahuljice s raznim dodacima	pšenica i njezini derivati; zob i njezini derivati; ječam i njegovi derivati; raž i njezini derivati; pira i njezini derivati; pšenoraž; emmer, kamut, zeleni oraščići; bulgur couscous, mekinje gore navedenih žitarica; ječmeni slad; müsli i žitarice za doručak napravljene od gore navedenih žitarica; tjestenina (svježa, suha, s punjenjenjem ili bez njega); slatki ili slani pečeni proizvodi (kruh, štapići, kolači, krekeri, pizza, keksi, pite, kroasani itd.)
Voće	sve vrste svježeg ili zamrznutog voća bez dodatka drugih sastojaka koji su zabranjeni; sve vrste orašastih plodova sa soli ili bez nje (sirovi, prženi, soljeni); voće u sirupu, suho ili dehidrirano voće koje nije preliveno brašnom (šljive, datulje, smokve, grožđice itd.)	kandirano voće	suho voće preliveno brašnom
Povrće	sve vrste povrća (sirovo, kuhano i suho); sve vrste smrznutog povrća bez dodatka drugih sastojaka koji su zabranjeni; konzervirano povrće (u ulju, octu, salamuri, soli itd.); svježe i konzervirane mahunarke (slanutak, grašak, grah, bob, leća, soja) bez dodatka arome i konzervansa, ojačivača okusa; pire rajčice, oguljena rajčica ili pasirana rajčica	gotova jela na bazi povrća	povrće sa žitaricama; panirano povrće ili povrće pečeno u brašnu; smrznuto povrće (prženi krumpir ili gljive) koje sadržava pšenicu i/ili njezine derivate
Mlijeko i mliječni proizvodi	svježe mlijeko ili mlijeko u tetrapaku; prirodni jogurt (punomasni ili bez masnoća); svježe vrhnje ili UHT vrhnje; svježi i zreli sirevi	napitci na bazi mlijeka; voćni jogurt; aromatizirano UHT vrhnje za kuhanje (s gljivama, lososom itd.); tučeno vrhnje; kreme i pudinzi; sirni namazi; sirevi s plijesni (kao Brie)	jogurt sa sladom, žitaricama ili keksima
Meso, riba, jaja	sve vrste mesa i ribe, svježi ili zamrznuti (bez dodatka ostalih sastojaka); pršut; konzervirane ribe prirodno, u ulju, dimljene ili zamrznute; jaja	čajne salame, naresci, kobasice, hrenovke itd.; meso u limenkama; umaci na bazi mesa ili ribe	panirano meso ili riba, uvaljano u brašno ili kuhano s umacima koji sadržavaju brašno s glutenom; kuhane zamrznute ribe (surimi ili imitacija raka)

Napitci	gazirani napitci; bezalkoholna pića i dijetna pića; čaj u filter-vrećicama, čaj bez kofeina, kamilica, kava, kava bez kofeina, biljni čajevi; voćni sokovi i nektari; alkoholna pića, bijelo, rose ili crveno vino, pjenušci i šampanjci, rakija, konjak, brandi, rum, tekila i ostali alkoholni napitci (osim zabranjenih)	voćni sirupi i sladoled; pripremljene mješavine za frappe, topla čokolada; viski, pšenična votka, gin	pivo; instant kava ili nadomjesci kave koji sadržavaju ječam ili ječmeni slad; zobeni napitci
Sladila i slatkiši	med; šećer; fruktoza; dekstroza; glukozni sirup	čokolade, praline; kakao u prahu; sladoled, ledene voćne lizaljke	kupovni kolači, savijače od pšenice, raži, ječma i zobi, instant želirani pudinzi, krem punjenja; kupovni slatkiši prekriveni pšeničnim brašnom; čokolada sa žitaricama i keksima

Pacijenti bi trebali izbjegavati žitarice koje sadrže gluten, ali i različite gotove proizvode u koje je namjerno ili slučajno dodan gluten (najčešće zob).^{24, 29} Konzumacija zobi u bezglutenskoj prehrani važna je zbog nutritivnih osobina zobi, dobar je izvor željeza, tiamina i prehrambenih vlakana.²⁹ Kontaminaciju je teško kontrolirati jer može nastati već prilikom uzgoja žitarice ili prilikom transporta, skladištenja, proizvodnje, pakiranja i distribucije.³⁰

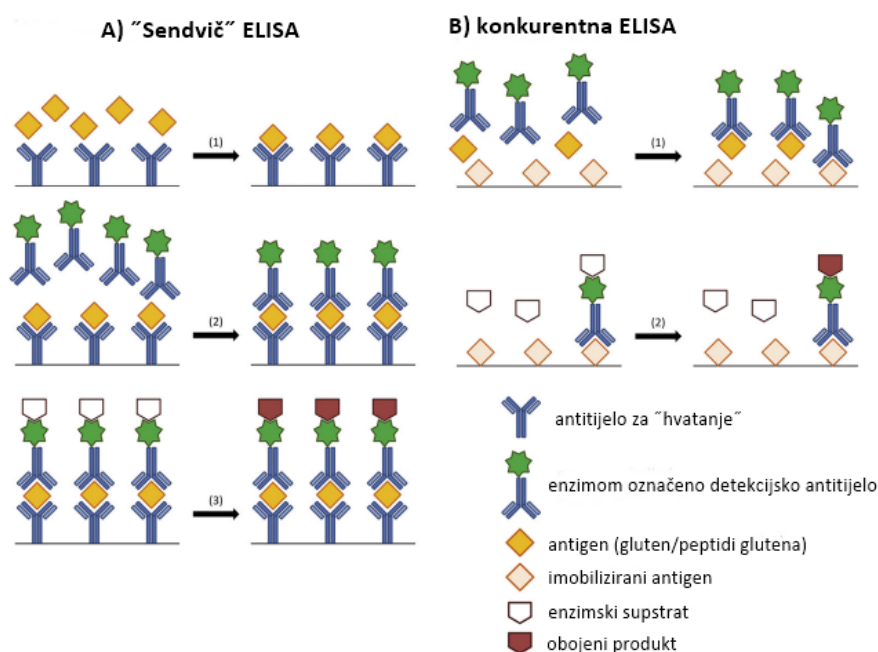
Osobe s intolerancijom na gluten prisiljene su na bezglutensku prehranu koja, osiromašena nutrijentima, ne pruža uravnoteženu prehranu. Najčešće se koriste škrobna brašna i brašna s niskim udjelom proteina, kao što je kukuruzno i rižino brašno. Kako bi se osiguralo bolje zdravstveno stanje takvih ljudi, neke zemlje su uvele obogaćivanje hrane nutrijentima, odnosno suplementiranje hrane. Brašna bez glutena obogaćuju se folnom kiselinom, cinkom, kalcijem, željezom i ostalim nutrijentima kojih manjka u bezglutenskoj hrani.³¹

Velik problem bezglutenske prehrane su troškovi takvog života. U jednom istraživanju znanstvenici su usporedili cijene prehrambenih proizvoda sa i bez glutena, u dva velika lanca trgovina prehrambenim proizvodima. Ustanovljeno je da su u prosjeku proizvodi bez glutena bili 242% skuplji nego obični proizvodi, žitarice te kruh i pekarski proizvodi bili su skuplji za 205% do 267% u usporedbi sa sličnim proizvodima koji sadrže gluten.²⁸ Također, u pojedinim trgovinama je teško pronaći bezglutenski proizvod, a često postoji sumnja radi li se uistinu o bezglutenskom proizvodu.²⁸

2.5. Metoda ELISA

Imunoenzimska metoda ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) je osjetljiva i precizna metoda za rutinsko određivanje alergena u hrani. Kvalitativno i kvantitativno određivanje temelji se na vezanja antitijela i antigena nakon čega slijedi spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije kompleksa nastalog reakcijom.^{32,33} U takvoj reakciji enzim je kovalentno vezan sa specifičnim antitijelom (imunoglobulin) koje prepoznaje ciljni antigen.³⁴ Koriste se i poliklonska i monoklonska antitijela, no postoji razlika u preciznosti rezultata jer monoklonska reagiraju s jednim, a poliklonska s više epitopa na antigenu.³⁴ Sam postupak pripreve uzorka uključuje postupak ekstrakcije u kojem se protein iz prehrambenog uzorka otapa pomoću odgovarajućeg ekstrakcijskog pufera.³² Metodom ELISA mogu se detektirati vrlo niske koncentracije analita (ng/kg).³

Postoje različite tehnike metode ELISA, najčešće se koristi „sendvič“ metoda, ali i indirektna metoda, konkurentna te višestruka i prijenosna metoda u mikrotitarskim jažicama. Tehnika „sendvič“ ELISA koristi se za detekciju antigena vezanjem na antitijelo imobilizirano na čvrstoj podlogi,^{4,34} pri čemu nastaje kompleks antigen-antitijelo (Slika 10).



Slika 10. Prikaz dvaju najčešćih mehanizama ELISA metode. A) mehanizam „sendvič“ ELISA tehnike. B) mehanizam konkurentne ELISA tehnike.³⁵

Apsorbancija je izravno proporcionalna količini antigena u ekstraktu uzorka, a količina se može izračunati iz kalibracijske krivulje pomoću referencijskog proteina glutena. Tehnika „sendvič“ ELISA pogodna je za određivanje velikih molekula alergena, kao što su glutenski proteini, antigen ima dva prostorno odvojena vezna mjesta za antitijela, jedno za hvatanje, drugo za detekciju.³⁵ S druge strane, tehnika konkurentne ELISA (Slika 10. b) koristi se za određivanje netaknutih proteina i manjih antigena (glutenski peptidi), koji imaju samo jedno vezivno mjesto za antitijelo.³⁵

Komercijalno dostupni ELISA testni setovi daju brze rezultate, ne zahtijevaju sofisticiranu laboratorijsku opremu, jednostavni su za rukovanje, pogodni za rutinske analize, metoda je često jeftinija od ostalih tehnika, daju zadovoljavajuće performanse u smislu ponovljivosti, obnovljivosti, oporavka i dovoljne osjetljivosti za otkrivanje glutena pri udjelima manjim od 20 mg/kg glutena.³⁵

Do sada je otkriveno nekoliko antitijela specifičnih za gluten i glijadin, pa su komercijalno dostupni različiti kitovi za testove ELISA (Skerritt, R5, G12 i a20 mAb ili pAb).³⁵

Primjerice test Skerritt prepoznaje epitope aminokiselinskog slijeda PQQPFPQE i PQQPPFPEE te reagira s glijadinima i prolaminima u raži i ječmu, a test R5 prepoznaje glijadine, sekaline i hordeine, ali pokazuje ograničenu reaktivnost i prema gluteninima, primarno prepoznaje epitop QQFPF, ali i sekvence QQQFP, LQFPF te QLFPF.³⁵ Tehnika „sendvič“ R5 ELISA koristi smjesu reagensa (*cocktail* otopine) odobrena je kao službena metoda za analizu netaknutog glutena u uzorcima na osnovu kukuruza te za određivanje djelomično hidroliziranog glutena.^{35, 36}

Testovi G12 i A1 mAb osjetljivi su na epitope QPQLPY i QLPYPQP, a koriste se za određivanje prolamina pšenice, raži i ječma, te je odobrena metoda za analizu netaknutog glutena u uzorcima na osnovu riže.³⁵ Danas se koriste noviji testovi, kao što je primjerice test a20 mAb, koji se temelji na reakciji određenih monoklonskih antitijela koji prepoznaju glijadine, sekaline i hordeine.³⁵ akreditirano tijelo ne provede izmjene valjanost akreditacija se ne produžuje.³⁸

2.6. Validacija

Većina hrane sadrži potencijalno opasne tvari, primjerice alergene. Da bi se zaštitile osobe s intolerancijama na određene tvari potrebna je svakodnevna kontrola hrane na tržištu. Ukoliko laboratorij želi biti konkurentan na tržištu informacija potrebno je da uvede i primjenjuje sustav kvalitete sukladno normi HRN EN ISO/IEC 17025. Kako bi se u laboratoriju mogla provesti analiza alergena, potrebno je odrediti parametre validacije za metodu koja se službeno koristi.³⁸

Validacija metode je postupak kojim se dokazuje da je korištena analitička metoda prikladna za tu svrhu, odnosno da služi za rješavanje određenog analitičkog problema. Rezultati analitičkih metoda daju određene vrijednosti uzorka, a kako bi te vrijednosti bile što bliže stvarnim vrijednostima potrebno je provesti validaciju analitičke metode. Vjerodostojni podatci i osiguranje kvalitete mogu se postići prema preporukama Dobre laboratorijske prakse (DLP), Dobre proizvođačke prakse (DPP), Dobre analitičke prakse (DAP), ISO normi (engl. *International Organization for Standardization*, ISO) i sl.⁴⁰

Validacija metode može biti potpuna ili djelomična, ovisno o tome radi li se o validaciji prije uvođenja nove analitičke metode u upotrebu, validaciji nakon promjene određenih uvjeta metode ili validaciji nakon promjene metode. Rezultati validacije ponekad mogu ukazati na nužnost promjene metode, nakon čega je potrebna validacija za tu novu metodu.⁴⁰

Parametari validacije su: specifičnost, selektivnost, preciznost, točnost, linearnost, granice detekcije i kvantifikacije te robusnost. Specifična metoda je ona metoda kojom se određuje samo jedan analit, a selektivnom metodom moguće je istovremeno odrediti više analita.⁴⁰

Preciznost je slaganje između rezultata niza mjerenja koji su provedeni na istom homogenom uzorku prema propisanim uvjetima. Preciznost se koristi za određivanje slučajnih pogrešaka, a uključuje ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost, najčešće se izražava pomoću standardnog odstupanja (SD), relativnog standardnog odstupanja (RSD) te raspona pouzdanosti srednje vrijednosti. Granice prihvatljivosti ovise o vrsti analize i matrici uzorka, a za određivanje sadržaja pojedinih analita u prehrambenim i ekološkim uzorcima prihvatljivo relativno standardno odstupanje je između 2 i 20 %.⁴⁰

Točnost predstavlja podudaranje između prihvaćene referentne vrijednosti i srednje vrijednosti koja je dobivena određenim postupkom, određeni broj puta. Iskorištenje ovisi postupku uzorkovanja, koncentraciji analita te o matrici uzorka.⁴⁰

Linearnost metode predstavlja mogućnost da metoda daje rezultate izravno proporcionalne koncentraciji analita u uzorku, unutar danog područja, a određuje se pomoću kalibracijske krivulje.⁴⁰

Granica detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, a granica kvantifikacije je najmanja količina analita koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Oba parametra se mogu procijeniti na temelju omjera signal/šum ili na osnovu standardnog odstupanja.⁴⁰

Robusnost je mjeru otpornosti analitičnog postupka na male, namjerne promjene uvjeta metode, a ispitivanjem robusnosti se određuje učinak validacijskih parametara na rezultate analize.⁴⁰

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

U ovom istraživanju prikupljeno je analizirano 30 prehrambenih komercijalno dostupnih uzoraka za koje se pouzdano zna da sadrže gluten, te uzorci za koje se zna da ga ne sadrže (Tablica 2). Uzorci su analizirani metodom ELISA u laboratoriju Odjela za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu hrane i predmeta opće uporabe na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“.

Tablica 2. Uzorci u kojima su metodom ELISA određeni udjeli glutena.

UZORCI	
Uzorak 1	pileća prsa
Uzorak 2	džem od mandarina
Uzorak 3	pekmez od šljive
Uzorak 4	dijetalni džem od jagode
Uzorak 5	namaz od crnih maslina
Uzorak 6	namaz od zelenih maslina
Uzorak 7	džem od šipka
Uzorak 8	džem od kupine
Uzorak 9	džem od aronije
Uzorak 10	džem od marelice
Uzorak 11	džem od jagode
Uzorak 12	džem od višnje
Uzorak 13	čokoladni poljupci
Uzorak 14	prazne kukuruzne kiflice
Uzorak 15	pivo 1 Staropramen dark
Uzorak 16	pivo 2 Ožujsko Tomislav

Uzorak 17	panirano pileće meso
Uzorak 18	cremonite za jelo i kuhanje
Uzorak 19	ajvar
Uzorak 20	raženi kruh s žitaricama bez glutena
Uzorak 21	kreker bez glutena
Uzorak 22	kukuruzne pahuljice bez glutena
Uzorak 23	smjesa za pekarske proizvode
Uzorak 24	tjestenina od kukuruza
Uzorak 25	bezglutenska mješavina za kruh
Uzorak 26	krupica od integralnog prosa
Uzorak 27	tjestenina od kukuruza i riže
Uzorak 28	rižoto sa sirom bez glutena
Uzorak 29	pivo 3 Gardia
Uzorak 30	pivo 4 Lowenbrau

U eksperimentalnom radu korišteni su uzorci komercijalno dostupnih piva 1-4, dva svijetla (*Lowenbrau* i *Gardia*) i dva tamna piva (*Ožujsko Tomislav* i *Staropramen dark*).

3.1.2. Kemikalije

U eksperimentalnom radu korišten je komercijalni set za test ELISA, *Ridascreen*[®] *Gliadin* (*R7001*) *ELISA test* (*R-Biopharm*, Njemačka), koji je i preporučena metoda za službenu kontrolu i određivanje glutena. Prema uputi proizvođača, *Ridascreen*[®] *Gliadin* testni kit potrebno je čuvati na 2-8 °C, a sve otopine reagensa testnog kita su navedene u Tablici 3 i prikazane na Slici 11.

Tablica 3. Komponente testnog kita *Ridascreen® Gliadin* (R7001).

KOMPONENTE	DETALJI	VOLUMEN
Standard 1	0 ng/ml glijadina	1,3 ml
Standard 2	5 ng/ml glijadina	1,3 ml
Standard 3	10 ng/ml glijadina	1,3 ml
Standard 4	20 ng/ml glijadina	1,3 ml
Standard 5	40 ng/ml glijadina	1,3 ml
Standard 6	80 ng/ml glijadina	1,3 ml
Kromogen (plavi čep)	mikstura, sadrži metanol, glicerol	7 ml
Konjugat (crveni čep)	koncentriran 11x, antitijelo konjugirano s peroksidazom	1,2 ml
Supstrat (zeleni čep)	mikstura, sadrži limunsku kiselinu	7 ml
Stop otopina žuti čep	mikstura, sadrži sumpornu kiselinu	14 ml
Otopina za razrjeđenje uzorka	koncentrirana 5x	60 ml
Pufer za ispiranje	koncentriran 10x, pH 7,1 (pri 20 °C)	100 ml
96 JAŽICA		
RIDA® EKSTRAKCIJSKA OTOPINA (RIDA® Cocktail)		105 ml



Slika 11. Reagensi ELISA testnog seta *Ridascreen® Gliadin*.

Za određivanje validacijskih parametara korišten je standardni komercijalno dostupan testni uzorak FAPAS, međulaboratorijski testni uzorak kojem je poznata masena koncentracija glutena, dobiven međulaboratorijskim ispitivanjem, odnosno organiziranjem, provedbom i ocjenom ispitivanja identičnih uzoraka u dva ili više laboratorija prema unaprijed određenim uvjetima.

Uz navedene reagense ELISA testnog seta *Ridascreen® Gliadin*, korišteni su reagensi (čistoće p.a.):

- destilirana voda
- 80%-tni etanol

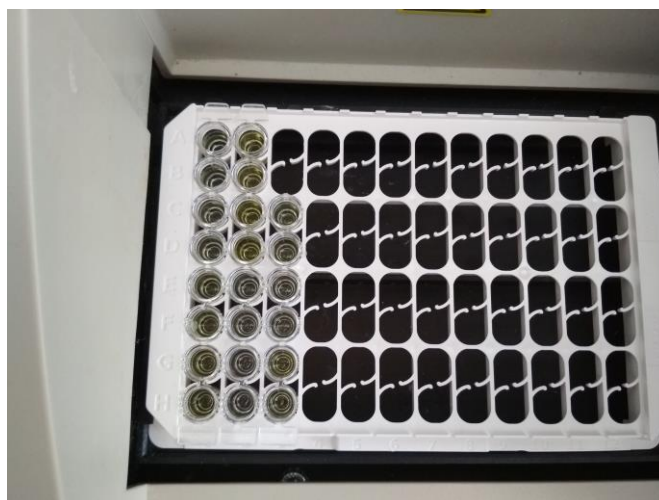
3.1.3. Laboratorijska oprema i pribor

- mikropipetor 8-kanalni 50 – 300 μ l i 1-kanalni 5-50 μ l (*Transferpette®*)
- analitička vaga s točnošću odvage $\pm 0,1$ g (*Mettler Toledo*)
- kivete za centrifugu
- centrifuga
- plastični pipetni nastavci
- vodena kupelj
- Vorteks (*Vortex Genie 2*)
- MRC kolorimetar
- rashladna komora

3.2. Postupak analize glutena

3.2.1. Načelo metode

Za analizu glutena u prehrambenim uzorcima korištena je metoda „sendvič“ ELISA. Na mikrotitarsku pločicu imobilizirana je poznata količina antitijela za glijadin R5, nakon čega se unosi uzorak ili standard. Smjesa se inkubira pri čemu nastaje kompleks antigen-antitijelo. Nakon toga se jažice isperu pomoću pufera za ispiranje čime se uklanjaju komponente koje se nisu vezale na antitijelo. Na suhu jažicu dodaje se enzim koji se veže za kompleks antigen-antitijelo. Slijedi ponovna inkubacija pri čemu nastaje „sendvič“ kompleks antitijelo-antigen-antitijelo te ponovno ispiranje. Zatim se dodaje supstrat i kromogen čime dolazi do promjene boje otopine iz bezbojne u plavu. Nakon ponovne inkubacije, dodaje se reagens za zaustavljanje reakcije (tzv. *stop reagens*) koji mijenja boju otopine iz plave u žutu (Slika 12), a zatim se pomoću kolorimetra očita apsorbanacija otopina u jažicama. Određivanje udjela glutena provodi pri 450 nm.



Slika 12. Žuto obojene otopine uzorka u jažicama nakon dodatka reagensa za zaustavljanje reakcije.

3.2.2. Priprema uzoraka i analiza

Prethodno homogeniziranih 0,25 g krutog uzorka (Slika 13) ili 0,25 ml tekućeg uzorka stavi se u kivetu za centrifugiranje, doda se otopina za ekstrakciju (2,5 ml *RIDA® Koktel*), promiješa se na vorteks miješalici 5-10 sekundi (Slika 14), slijedi inkubacija 40 minuta u vodenoj kupelji na 50 °C i hlađenje uzorka.



Slika 13. Vaganje uzorka u tubu za centrifuge.



Slika 14. Miješanje otopine na vorteks mješalici.

Zatim se uzorku doda 7,5 ml 80%-tnog etanola i promiješa na vorteks mješalici sat vremena, a nakon toga centrifugiraju 10 minuta na 2500 okretaja. Za pripremu uzorka koristi se razrijeđeni pufer u volumnom omjeru 1:5 (1 ml pufera + 4 ml destilirane vode). Alikvot uzorka se razrijedi s otopinom pufera u volumnom omjeru 1:12,5 (80 μ l uzorka + 920 ml razrijeđenog pufera).

100 μ l tako pripremljenog uzorka se unese u jažicu, inkubira na sobnoj temperaturi 30 minuta te se nakon inkubacije tekućina izlije iz jažica mikrotitarske pločice.

Jažice se ispiru s 250 μ l otopine za ispiranje, koja je pripremljena u volumnom omjeru 1:10 (1 ml pufera za ispiranje + 9 ml destilirane vode), te se tekućina ponovno ukloni. Isti postupak ponovi se tri puta. Za unos uzorka korištena je 8-kanalna mikropipeta (Slika 15).



Slika 15. Multikanalna mikropipeta za dodavanje reakcijskih otopina.

Na suhu jažicu doda se 100 μ l razrijeđenog konjugata u volumnom omjeru 1:11 (1 ml konjugata + 9 ml destilirane vode) i inkubira se 10 minuta na sobnoj temperaturi.

Jažice se ispiru tri puta, doda se 50 μ l supstrata i 50 μ l reagensa za boju (kromogena) u svaku jažicu te se inkubira 30 minuta na sobnoj temperature i u mraku.

Razvijanje plave boje otopine ukazuje na prisutnost gluten u uzorku, a intenzitet boje proporcionalan je udjelu glutena. Dodatkom 100 μ l otopine za zaustavljanje reakcije nastajanja kompleksa (*stop* otopina) dolazi do promjene boje otopine u žutu, otopini se izmjeri apsorbancija pri 450 nm pomoću kolorimetra MRC unutar 30 minuta (Slika 16).

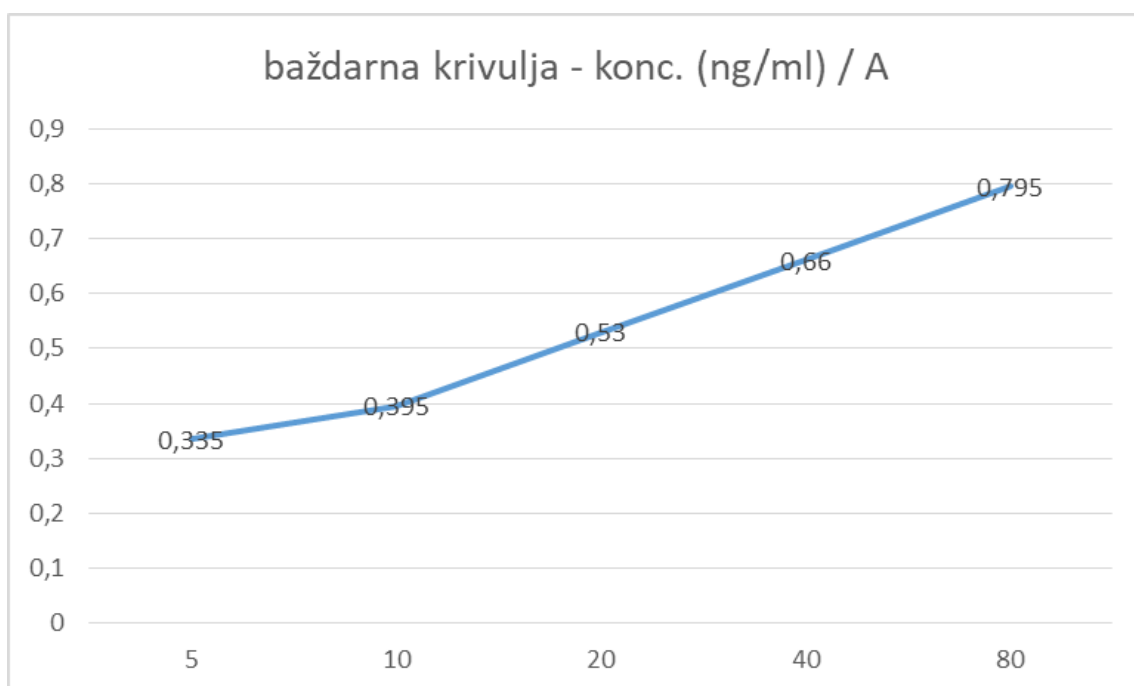


Slika 16. Kolorimetra MRC korišten za analizu glutena metodom ELISA.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U svrhu zaštite osoba osjetljivih na gluten važno je da su prehrambeni bezglutenski proizvodi sigurni, pravilno i točno opisani (deklarirani). Bezglutenski proizvodi obično su skuplji od proizvoda s glutenom pa su česte namjerne nepravilnosti pri označavanju proizvoda. Isto tako, moguća je namjerna kontaminacija hrane glutenom u svrhu dobivanja boljih svojstava ili povećanja volumena proizvoda. Stoga je od izuzetne važnosti kontrola bezglutenskih proizvoda na prisutnih na tržištu. U okviru ovog diplomskog rada provedeno je istraživanje u svrhu provjere kontaminacije prehrambenih proizvoda i točnosti opisa udjela glutena u prehrambenim proizvodima na tržištu. Za određivanje glutena korištena je imunenzimska metoda ELISA koja je prethodno validirana.

Prilikom svakog mjerenja standarda i uzoraka korišten je MRC kolorimetar, a apsorbancija je mjerena pri 450 nm. Mjerenjem apsorbancije standarda različitih koncentracijskih točaka (5 različitih koncentracija) izradi se baždarna krivulja (Slika 17) iz koje se očita nepoznata količina glijadina u uzorku.



Slika 17. Baždarna krivulja (ovisnost apsorbancije o koncentraciji glijadina).

Iz literaturnih podataka poznato je da je udio glijadina polovica svih proteina prisutnih u glutenu, pa se za koncentraciju glutena, rezultat se pomnoži s dva (programski omogućeno u većini instrumenata za mjerenje udjela glutena. Prikaz rezultata dobivenih kolorimetrom prikazan je na Slici 18.

broj mjerenja	ID	apsorbancija			UZORCI		glijadin mg/kg	gluten mg/kg
		(CV)	(%)	ng/ml	*	=		
1	01924/20	0.242E	3.8	30.4	< 5.00	500.00	< 2.50	< 5.00
2	01925/20	0.292E	26.9	36.7	< 5.00	500.00	< 2.50	< 5.00
3	01296/20	0.397E	1.8	49.9	10.07	500.00	5.04	10.07
4	01297/20	0.283E	1.0	35.6	< 5.00	500.00	< 2.50	< 5.00
5	27216A kontrola Fapas	0.529E	8.3	66.5	19.98	500.00	9.99	19.98

Slika 18. Rezultati analize udjela glijadina i glutena dobiveni kolorimetrom MRC.

4.1. Validacija metode

4.1.1. Preciznost

a) Ponovljivost

Ponovljivost je određena ponovljenim mjerenjem (šest puta) na šest istovrsnih testnih uzoraka FAPASA čija masena koncentracija glutena iznosi 35,0 mg/kg, a zatim izračunata srednja vrijednost (SV), standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD) izmjerenih apsorbancija (Tablica 5). Dobivena ponovljivost za šest mjerenja istog uzorka na temelju RSD (%) iznosi 0,133 i nalazi se unutar granica prihvatljivosti za navedenu metodu.

Tablica 5. Rezultati mjerenja pri određivanju ponovljivosti metode pripreme uzorka.

uzorak br.	mjerenje					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1	1,521	1,519	1,517	1,506	1,510	1,518
2	1,510	1,506	1,508	1,503	1,503	1,510
3	1,501	1,497	1,495	1,484	1,488	1,494
4	1,513	1,512	1,512	1,507	1,507	1,514
5	1,515	1,512	1,513	1,511	1,512	1,514
6	1,476	1,473	1,474	1,470	1,471	1,472
SV	1,503					
SD	0,002					
Ukupni RSD%	0,133					

b) Ponovljivost mjerenja masene koncentracije standarda
 Eksperiment je proveden mjerenjem apsorbancija standarda glutena (glijadina) masenih koncentracija: 5, 10, 20, 40 i 80 mg/kg, mjerenje je na istom uzorku ponovljeno šest puta, a zatim je izračunata: srednja vrijednost (SV), standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD) dobivenih apsorbancija uzoraka. Prema podacima u Tablici 6 najviša vrijednost za RSD (%) je 0,31 i nalazi se unutar granica prihvatljivosti metode.

Tablica 6. Rezultati mjerenja masene koncentracije pri određivanju ponovljivosti pripreme standarda glutena.

w (mg/kg)	mjerenje						SV	SD	RSD/ %
	1.	2.	3.	4.	5.	6.			
5	0,325	0,325	0,325	0,326	0,327	0,327	0,326	0,001	0,31
10	0,396	0,396	0,396	0,397	0,397	0,397	0,397	0,001	0,25
20	0,534	0,535	0,535	0,535	0,536	0,536	0,535	0,001	0,19
40	0,662	0,663	0,663	0,665	0,665	0,665	0,664	0,001	0,15
80	0,797	0,797	0,797	0,799	0,801	0,801	0,799	0,002	0,25

c) Međupreciznost

Eksperiment je proveden u kontroliranim uvjetima, jednakim postupkom pripreme uzoraka koncentracije 35,0 mg/kg, s dva različita analitičara. Nakon provedenog mjerenja izračunata je srednja vrijednost masenih koncentracija glutena u uzorcima (SV), standardno odstupanje (SD) te relativno standardno odstupanje (RSD) (Tablica 7).

Tablica 7. Rezultati mjerenja masene koncentracije pri određivanju međupreciznosti metode.

broj uzorka	ANALITIČAR 1	ANALITIČAR 1
1	26,86	27,48
2	26,20	24,29
3	25,67	24,86
4	26,38	27,55
5	26,50	26,89
6	24,24	24,86
SV (mg/kg)	25,98	25,99
SD	0,94	1,48
RSD %	3,61	5,69
Ukupni SV (mg/kg)		25,98
SD		0,38
Ukupni RSD %		1,46

Sve vrijednosti masenih koncentracija uzorka glutena imaju RSD (%) manji od 1,46 te se nalaze unutar granica prihvatljivosti metode.

4.1.2. Točnost metode

Točnost metode za određivanje gliadina definirana je na temelju analitičkog povrata metode. Analitički povrat određuje točnost određivanja i ujedno ukazuje na moguću sustavnu pogrešku. Eksperiment je proveden na certificiranim referencijskim standardima A, B i C pri tri različite koncentracije glijadina ($w(A) = 6,0$ mg/kg, $w(B) = 23,0$ mg/kg, $w(C) = 48,0$ mg/kg). Točnost metode iskazana je kao postotni udio izmjerenog analita prema njegovoj stvarnoj količini (Tablica 8).

Tablica 8. Točnost metode iskazana kao postotni udio izmjerenog standarda prema njegovoj stvarnoj količini za glijadin.

uzorak A	w(glijadin) / mg kg⁻¹	Točnost metode / %
1	6,66	111,0
2	5,86	97,7
3	4,76	79,3
4	4,71	78,5
5	4,94	82,33
6	5,13	85,5
srednja vrijednost (SV)	5,34	89,05
SD	0,77	12,80
RSD %	14,41	14,37
uzorak B	w(glijadin) / mg kg⁻¹	Točnost metode / %
1	20,01	87,00
2	24,05	104,56
3	26,39	114,73
4	24,86	108,08
5	22,84	99,30
6	24,78	107,73
SV	23,82	103,57
SD	2,20	9,55
RSD %	9,23	9,22
uzorak C	w(glijadin) / mg kg⁻¹	Točnost metode / %
1	42,85	89,27
2	50,13	104,43
3	45,19	94,14
4	41,57	86,60
5	49,01	102,10
6	40,45	84,27
SV	44,87	93,47
SD	3,99	8,30
RSD %	8,89	8,87
UKUPNA SV		95,36
SD		7,44
RSD %		7,80

Točnost je iskazana kao postotni udio izmjerenog standarda prema njegovoj stvarnoj količini i iznosio je 95,36 % te se nalazi unutar statistički prihvatljivih granica (nema preveliko odstupanje od stvarne vrijednosti) i metoda je prihvatljiva za rutinsku analizu.

4.1.3. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije određena je na testnom uzorku FAPAS i za gluten iznosi 5 mg/kg. Standardni uzorak FAPAS pripremljen je u šest paralelnih uzoraka kojima je izmjerena apsorbanacija, a relativno standardno odstupanje (RSD), za uzorke glutena iznosi 12,35 %.

Validacijski parametri te njihovi kriteriji prihvatljivost^{41, 42, 43} za određivanje glutena u hrani imunoenzimskom ELISA metodom prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Rezultat određivanja parametara validacije i kriteriji prihvatljivosti.^{41, 42, 43}

VALIDACIJSKI PARAMETAR	REZULTAT	KRITERIJ PRIHVATLJIVOSTI
Preciznost*		
-ponovljivost pripreme uzorka	RSD= 0,13%	RSD≤ 20%
-ponovljivost mjerenja standarda	RSD= 0,31%	RSD≤ 20%
-međupreciznost	RSD= 1,46%	RSD≤ 20%
Točnost**	95,36 %	80-120%
Granica kvantifikacije***	5,0 mg/kg	≤5,0 mg/kg
*Kriterij prema seminaru Validacija analitičkih metoda, HMD (2002)		
** Abbott i suradnici (2002) <i>Guideline for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis: AOAC Appendix D</i>		
***Uputa proizvođača Ridascreen® Gliadin		

Na temelju rezultata prikazanih u Tablici 10. može se zaključiti kako su svi parametri validacije nalaze unutar statistički prihvatljivih granica prihvatljivosti i stoga se određivanje glutena u hrani može provesti metodom ELISA, dobiveni rezultati metode mogu se smatrati pouzdanim i preciznim.

4.2. Određivanje udjela glutena metodom ELISA

Metodom „sendvič“ ELISA određen je maseni udio glutena u različitim prehrambenim proizvodima komercijalno dostupnim u prodavaonicama na hrvatskom tržištu. Analiza je provedena na 30 različitih uzoraka od kojih su 4 uzorka pive za koje se zna da sadrže gluten, a ostalih 26 analiziranih uzoraka su proizvodi za koje je jasno navedeno da su bezglutenski ili je poznato da su to proizvodi koji su prirodno bezglutenski. Rezultati određivanja masenog udjela glutena u 30 odabranih prehrambenih proizvoda prikazani su u Tablici 4. (plavo označeno su prirodno bezglutenski prehrambeni proizvodi, žuto označeni su proizvodi za koje se zna da sadrže gluten, dok su ljubičasto označeni proizvodi koji su vidljivo označeni (deklarirani) kao bezglutenski.

Tablica 4. Udio glutena u 30 različitih prehrambenih proizvoda.

OZNAKA UZORKA	OPIS PROIZVODA	MASENI UDIO GLUTENA (mg/kg)
Uzorak 1	pileća prsa	8,1
Uzorak 2	džem od mandarina	<5,0
Uzorak 3	pekmez od šljive	10,1
Uzorak 4	dijetalni džem od jagode	<5
Uzorak 5	namaz od crnih maslina	9,7
Uzorak 6	namaz od zelenih maslina	<5
Uzorak 7	džem od šipka	<5
Uzorak 8	džem od kupine	<5
Uzorak 9	džem od aronije	<5
Uzorak 10	džem od marelice	<5
Uzorak 11	džem od jagode	<5
Uzorak 12	džem od višnje	<5
Uzorak 13	čokoladni poljupci	<5
Uzorak 14	prazne kukuruzne kiflice	<5

Uzorak 15	pivo 1 <i>Staropramen dark</i>	75,5
Uzorak 16	pivo 2 <i>Ožujsko Tomislav</i>	122,15
Uzorak 17	panirano pileće meso	6,9
Uzorak 18	<i>cremonite</i> za jelo i kuhanje	<5
Uzorak 19	ajvar	<5
Uzorak 20	raženi kruh s žitaricama bez glutena	<5
Uzorak 21	kreker bez glutena	9,2
Uzorak 22	kukuruzne pahuljice bez glutena	5,3
Uzorak 23	smjesa za pekarske proizvode	8,6
Uzorak 24	tjestenina od kukuruza	<5
Uzorak 25	bezglutenska mješavina za kruh	<5
Uzorak 26	krupica od integralnog prosa	8,6
Uzorak 27	tjestenina od kukuruza i riže	<5
Uzorak 28	rižoto sa sirom bez glutena	<5
Uzorak 29	pivo 3 <i>Gardia</i>	142,8
Uzorak 30	pivo 4 <i>Lowenbrau</i>	52,3

Uzorci piva 15, 16, 29 i 30 su uzorci za koje se zna da sadrže gluten, no u Tablici 4. je primjetno da samo uzorci piva 15 i 30 sadrže količinu glutena u masenim koncentracijama između 20 i 100 mg/kg i stoga se mogu svrstati u proizvode s vrlo malim sadržajem glutena. Uzorak piva 16 sadrži 122,15 mg/kg glutena, dok uzorak 29 sadrži 142,8 mg/kg glutena. Uzorci piva 16 i 29 sadrže količine glutena veće od 100 mg/kg, prema Uredbi (EU) br. 828/2014 svrstavaju se u proizvode koji sadrže gluten te bi se prilikom označavanja takvog proizvoda to trebalo navesti. Svi ostali prehrambeni uzorci sadrže količine glutena manje od 20 mg/kg i stoga se prema Uredbi (EU) br. 828/2014 svrstavaju u proizvode bez glutena. Nadalje, neki od proizvoda u svom prirodnom sastavu ne sadrže gluten i mjerenjima u okviru ovog diplomskog rada utvrđeno je kako nije došlo do njihove kontaminacije glutenom. Iz nekih proizvoda je gluten uklonjen, a sadržavali su oznaku da su bezglutenski, što nije potpuno u skladu s preporukama za označavanje prehrambenih proizvoda.

§ 5. ZAKLJUČAK

Imunoenzimskom metodom „sendvič“ ELISA određen je maseni udio glutena u različitim prehrambenim proizvodima komercijalno dostupnim u prodavaonicama na hrvatskom tržištu. Analiza je provedena na 30 različitih uzoraka od kojih su 4 uzorka pive za koje se zna da sadrže gluten. Ostalih 26 analiziranih uzoraka su proizvodi za koje je jasno navedeno da su bezglutenski ili se zna da su to proizvodi koji su prema sastavu prirodno bezglutenski.

Metoda je validirana i može se zaključiti kako su svi parametri validacije nalaze unutar statistički prihvatljivih granica prihvatljivosti metode i stoga se određivanje glutena u hrani može provesti imunoenzimska ELISA metoda, a dobiveni rezultati metode mogu se smatrati pouzdanim i preciznim. Točnost je iskazana kao postotni udio izmjerenog standarda prema njegovoj stvarnoj količini i iznosio je 95,36 % što se nalazi unutar statistički prihvatljivih granica metode (nema preveliko odstupanje od stvarne vrijednosti) i metoda je prihvatljiva za rutinsku analizu. Sve vrijednosti masenih koncentracija uzorka glutena imaju RSD (%) manji od 1,46 te se nalaze unutar granica prihvatljivosti metode. Granica kvantifikacije određena je na testnom uzorku FAPAS i za gluten iznosi 5 mg/kg.

Od 30 analiziranih uzoraka, odabrana su i 4 za koja se pretpostavlja da sadrže gluten. U konačnici, 2 uzorka piva su imala koncentraciju glutena veću od 100 mg/kg te se prema Uredbi (EU) br. 828/2014 ne mogu smatrati bezglutenskim, 2 uzorka piva su imali udio glutena između 20 i 100 mg/kg te se kao takvi mogu smatrati kao proizvodni s niskim udjelom glutena. Ostalih 26 uzoraka su imali koncentraciju glutena manju od 20 mg/kg i prema Uredbi (EU) br. 828/2014 se mogu smatrati bezglutenskim.

Neki od proizvoda u svom prirodnom sastavu ne sadrže gluten i mjerenjima u okviru ovog diplomskog rada utvrđeno je kako nije došlo do njihove kontaminacije glutenom. Iz nekih proizvoda gluten je uklonjen tehnološkim postupkom, sadržavali su oznaku da su bezglutenski te je utvrđeno da je to bilo u skladu s preporukama za označavanje prehrambenih proizvoda.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

CeD – celijakija (engl. *celiac disease*)

DAP – Dobra analitička praksa

DLP – Dobra laboratorijska praksa

DPP – Dobra proizvođačka praksa

ELISA – imunoenzimska metoda (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EPIT – epikutana imunoterapija (engl. *epicutaneous immunotherapy*)

GFD – bezglutenska prehrana (engl. *gluten free diet*)

HAA – Hrvatska akreditacijska agencija

IgA, IgE, IgG – imunoglobulin A, E, G (engl. *immunoglobulin A, E, G*)

ISO – norme za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*)

mAb – monoklonsko antitijelo (engl. *monoclonal antibody*)

NCGS – preosjetljivost na gluten (engl. *non – celiac gluten sensitivity*)

OIT – oralna imunoterapija (engl. *oral immunotherapy*)

pAb – poliklonsko antitijelo (engl. *polyclonal antibody*)

RSD – relativno standardno odstupanje (engl. *relative standard deviation*)

SD – standardno odstupanje (engl. *standard deviation*)

SLIT – sublingvalna imunoterapija (engl. *sublingual immunotherapy*)

SV – srednja vrijednost

SPR – rezonancija površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance*)

TG – transglutaminaza (engl. *transglutaminase*)

tTg – tkivna transglutaminaza (engl. *tissue transglutaminase*)

WDEIA – anafilaksa izazvana vježbanjem, ovisna o pšenici (engl. *wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. R. Biesiekierski, *J. Gastroenterol. Hepatol.* **32** (2017) 78–81.
2. A. Barros, F. Cosme, *Food Technol. Biotechnol.* **51** (2013) 153–158.
3. A. Cianferoni, *J. Asthma Allergy* **9** (2016) 13–25.
4. I. Poljanec, N. Vahčić, G. Krešić, S. K. Kravar, N. Kudumija, J. Pleadin, *Meso* **19** (2017) 426–433.
5. M. Volpicella, C. Leoni, M. C. G. Dileo, L. R. Ceci, *Cells* **8** (2019) 1073.
6. J. R. Biesiekierski, J. G. Muir, P. R. Gibson, *Curr. Allergy Asthma Rep.* **13** (2013) 631–638.
7. P. R. Shewry, N. G. Halford, P. S. Belton, A. S. Tatham, *Philos. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **357** (2002) 133–142.
8. X. Zhang, *Aust. J. Chem.* **67** (2013) 6–10.
9. H. Wieser, *Food Microbiol.* **24** (2007) 115–119.
10. A. V. Balakireva, A. A. Zamyatnin, *Nutrients.* **8** (2016) 644.
11. D. A. van Heel, J. West, *Gut.* **55** (2006) 1037–1046.
12. J. A. Tye-Din, H. J. Galipeau, D. Agardh, *Front. Pediatr.* **6** (2018) 350.
13. P. H. R. Green, C. Cellier, *N. Engl. J. Med.* **357** (2007) 1731–1743.
14. M. Lukić, A. Segec, I. Segec, Lj. Pinotić, J. M. Ahić, R. Gmajnić, K. Pinotić, A. Vcev, *Coll. Antropol.* **34** (2010) 55–60.
15. M. Bituh, V. Žižić, I. P. Krbavčić, Z. Zadro, I. C. Barić, *Food Technol. Biotechnol.* **49** (2011) 511–516.
16. M. Hadjivassiliou, D. S. Sanders, N. Woodroffe, C. Williamson, R. A. Grünewald, *Cerebellum.* **7** (2008) 494–498.
17. M. Hadjivassiliou, D. D. Sanders, D. P. Aeschlimann, *Dig. Dis.* **33** (2015) 264–268.
18. S. Kárpáti, *Clin. Dermatol.* **30** (2012) 56–59.
19. K. Palosuo, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **3** (2003) 205–209.
20. A. Sapone, K. M. Lammers, V. Casolaro, M. Cammarota, M. T. Giuliano, M. De Rosa, R. Stefanile, G. Mazzarella, C. Tolone, M. I. Russo, P. Esposito, F. Ferraraccio, M. Carteni, G. Riegler, L. de Magistris, A. Fasano, *BMC Med.* **9** (2011) 23.

§ 7. Literaturni pregled

21. L. Elli, L. Roncoroni, M. T. Bardella, *World J. Gastroenterol.* **21** (2015) 8221–8226.
22. U. Volta, G. Caio, F. Tovoli, R. De Giorgio, *Cell Mol. Immunol.* **10** (2013) 383–392.
23. U. Volta, M. T. Bardella, A. Calabrò, R. Troncone, R. Corazza, *BMC Med.* **12** (2014) 85.
24. I. Barbarić, *Med. Flum.* **44** (2008) 3–4.
25. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX:32014R0828> (datum pristupa 20. srpnja 2020.)
26. I. P. Krbavčić, *Medicus* **17** (2008) 87–92.
27. <https://lifelogiconline.wordpress.com/2011/05/11/why-gluten-free/gluten-free-symbol-2/> (datum pristupa 6. kolovoza 2020.)
28. B. Niland, B. D. Cash, *Gastroenterol. Hepatol.* **14** (2018) 82–93.
29. N. Pellegrini, C. Agostoni, *J. Sci. Food Agric.* **95** (2015) 2380–2385.
30. M. Radman, *Primjena NIR spektroskopije u detekciji glutena kao kontaminanta hrane*, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 14.
31. D. Palić, *Nutritivni deficiti bezglutenske prehrane*, Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 12–14.
32. A. B. Do, S. E. Khuda, G. M. Sharma, *J AOAC Int.* **101** (2018) 23–35.
33. A. Butorac, M. Marić, M. B. Sabolović, M. Hruškar, S. R. Brnčić, V. B. Družina, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **8** (2013) 90–101.
34. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, 1. hrvatsko izdanje, str. 87–88.
35. K. A. Scherf, R. E. Poms, *J. Cereal Sci.* **67** (2016) 112–122.
36. K. Scherf, M. Lacorn, T. Weiss, P. Wehling, M. Arlinghaus, *J. AOAC Int.* **102** (2019) 1535–1543.
37. X. Weng, G. Gaur, S. Neethirajan, *Biosensors* **6** (2016) 24.
38. HAA-Pr-2/1, *Pravila za akreditaciju tijela za ocjenjivanje sukladnosti*, HAA, 13. izdanje, prosinac 2011.
39. <https://akreditacija.hr/registar/> (datum pristupa 11. kolovoza 2020.)
40. *Validacija analitičkih metoda*, HMD, Zagreb 2002.
41. Skripta sa seminara *Validacija analitičkih metoda*, HMD (2002).
42. Abbott, *Guideline for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis: AOAC Appendix D* (2002).
43. Upute za pripravu reagensa proizvođača *Ridascreen® Gliadin*.

