

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Nikola Nováková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická
Ústav organické chemie a technologie
Farmakochemie a medicínální materiály

Moderní analytické metody na sledování alergenů v potravinách

Bakalářská práce

2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 2. 1. 2017

Nikola Nováková

Poděkování:

Děkuji panu Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá potravinovými alergeny. Mezi nejvýznamnější alergeny patří potraviny obsahující lepek, koryši, vejce, ryby, jádra podzemnice olejné, sója, mléko, skořápkové plody, celer, hořčice, sezamová semena, oxid siřičitý a siřičitany, vlní bob a měkkýši. V první části je uvedena charakteristika potravinové alergie, příznaky alergické reakce a legislativa České republiky, která se týká potravinových alergenů a jejich pravidel označování na obalech potravin. U každé skupiny alergenů je vyjmenován hlavní alergen či alergeny, většinou bílkovinné povahy. Druhá část je věnována instrumentálním a dalším metodám stanovení výskytu prvních sedmi skupin alergenů v potravinách.

KLÍČOVÁ SLOVA

alergie, potravinové alergeny, příznaky alergické reakce, stanovení alergenů

TITLE

Modern analytical methods for determination allergens in foods

ANNOTATION

Food allergens are the topic of this bachelor thesis. Foodstuffs containing a wheat, a crustacean shellfish, an egg, a fish, a peanut kernel, a soy, a milk, tree nuts, a celery, a mustard, a sesame seeds, a sulphur dioxide and sulphites, a lupin, and a mollusk shellfish are the most important allergens. The characteristics of food allergies, their symptoms and the Czech legislation about food allergens are described in the first part of the thesis. The main allergen(s) are listed at each allergen group, predominantly containing protein. The instrumental and other analytical methods for determinations of allergens in foodstuffs are summarized and characterized in the second part of this bachelor thesis.

KEYWORDS

allergy, food allergens, allergic reactions, determination of allergens

Obsah

0 Úvod.....	11
1 Teoretická část	12
1.2. Alergická reakce	12
1.3. Potravinové alergený	13
1.4. Zkřížená reakce.....	13
1.5. Projevy potravinové alergie	17
1.5.1. Anafylaktická reakce	17
1.5.2. Orálně alergický syndrom	17
1.5.3. Kožní příznaky.....	17
1.5.4. Respirační příznaky.....	18
1.5.5. Gastrointestinální příznaky	18
1.6. Legislativa.....	18
1.7. Značení alergenů na obalech a u pokrmů	19
1.8. Jednotlivé skupiny alergenů podléhající legislativě	20
1.8.1. Obiloviny obsahující lepek	20
1.8.2. Korýši.....	21
1.8.3. Vejce	22
1.8.4. Ryby	23
1.8.5. Jádra podzemnice olejný (arašídý).....	24
1.8.6. Sójové boby – sója	25
1.8.7. Mléko	26
1.8.8. Skořápkové plody.....	27
1.8.9. Celer	28
1.8.10. Hořčice	28
1.8.11. Sezamová semena.....	29

1.8.12.	Oxid siřičitý a siřičitany	29
1.8.13.	Vlčí bob – lupina	30
1.8.14.	Měkkýši	31
2	Analytické metody stanovení alergenů v potravinách.....	32
2.1.	Lepek	32
2.2.	Tropomyosin u korýšů	34
2.3.	Bílkovinné alergeny ve vejcích.....	37
2.4.	Parvalbumin u ryb.....	38
2.5.	Bílkovinné alergeny u arašídů	39
2.6.	Alergeny sóji.....	40
2.7.	Alergeny v mléce	40
3	Závěr	43
	Seznam zdrojů.....	Chyba! Záložka není definována.

Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1: Seznam alergenů	19
Obrázek 2: Komerčně dostupné ELISA kity	35
Obrázek 3: ELISA metody	35
Obrázek 4: Ukázka pozitivní reakce na mikrotitrační destičce	36
Obrázek 5: Schéma metody ELISA u stanovení alergenů mléka	41
Tabulka 1: Zkřížené alergeny	14
Tabulka 2: Názvy prolaminů v obilí	20
Tabulka 3: Přehled korýšů a kódů jejich tropomyosinů	22
Tabulka 4: Základní alergeny ve vejcích	22
Tabulka 5: Nejlépe probádané parvalbuminy	23
Tabulka 6: Přehled alergenů arašídů	24
Tabulka 7: Známé alergeny sóji s jejich základními funkcemi	26
Tabulka 8: Seznam hlavních alergenů v různých druzích stromových ořechů	28
Tabulka 9: Přehled označení siřičitanů jejich E-kódem	30
Tabulka 10: Nejznámější měkkýši s jejich hlavní alergenní látkou	31
Tabulka 11: Detekční limity u korýšů	36

Seznam zkratek

IgE	imunoglobulin E
OAS	orálně alergický syndrom
GIT	gastrointestinální trakt
ČSN	česká technická norma
DPV	diferenčně pulzní voltametrie
ELISA	enzymimunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
SELDI	laserová desorpce zvýšená povrchem (surface enhanced laser desorption ionization)
MALDI	ionizační metoda pomocí laserové desorpce s přispěním matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization)
SPR	rezonance povrchových plazmonů (surface plasmon resonance)
JET	jednoduchý enzymatický test
SPE	extrakce tuhou fází
PPM	částic na jeden milion (parts per million)

0 Úvod

V minulosti se alergenům nevěnovala tak důkladná pozornost, jako v posledních několika letech, kdy se označení alergenů muselo z důvodu nařízení Evropské unie povinně zavést do jídelních lístků ve všech restauracích, jídelnách a provozovnách rychlého občerstvení. Alergeny se tak staly velmi diskutovanou oblastí v gastronomii.

Seznam alergenů tvoří 14 skupin, kdy každá ze skupin obsahuje velké množství potravin, ve kterých příslušný alergen nalezneme. Požití potravin, která obsahuje určitý alergen, může mít pro jedince velmi vážné následky. Vyvolá takzvanou alergickou reakci, která má různé projevy a stupně. Alergeny nenalezneme pouze v potravinách, ale vyskytují se všude kolem nás. Jedná se například o pyly, zvířecí srst, prachové částice a další.

Alergie je definována jako skupina chorob, u nich opakovaná expozice neškodným antigenům zevního prostředí (alergenům) navozuje ve tkáních a nejrůznějších orgánech zánětlivé změny. Tyto změny následně vedou k poruchám struktury a funkce. Alergen je jakýkoli antigen schopný vyvolat alergickou odpověď. Tento termín se užívá jak pro zdroj alergenu (např. roztoči, zvířecí srst, ...), tak pro konkrétní imunochemické nebo molekulárně definované antigenní struktury [1].

Potravinovou alergií nebo intolerancí trpí přibližně 1-3 % dospělé populace, u dětí je hranice vyšší a dosahuje 4-6 %, ale často se stává, že u nejmenších dětí dochází ke spontánnímu uzdravení. U počtu postižených se jedná o hrubý odhad. V současnosti nelze potravinovou přecitlivělost léčit. Alergické reakci lze předcházet pouze vyřazením některých potravin z jídelníčku. Dobrou zprávou pro alergiky je, že nabídka potravin, které jsou prosty některých alergenů, se stále rozrůstá. Nejčastěji se jedná o produkty, které jsou označovány jako bez laktózy či bezlepkové a v zahraničí se již často vyskytují potraviny označované jako „nut-free“, kde výrobce garantuje nepřítomnost ořechů a arašídů v potravinách [2]. Potravinové alergen je tedy nutno sledovat, protože výskyt určitého alergenu může být i u potravin, u které bychom to nečekali. Jednotlivé alergen mají různé chemické vlastnosti a tím pádem také rozmanité možnosti stanovení.

1 Teoretická část

V této kapitole jsou popsány teoretické základy k pochopení mechanismů alergické reakce, příznaky potravinových alergií a následně rozebrány jednotlivé skupiny alergenů v potravinách dle legislativy.

1.1. Alergen

Za alergen můžeme považovat jakýkoliv antigen, který může vyvolat imunitní nebo alergickou odpověď, která má za následek poškození hostitelského organismu. Většinou se jedná o látky glykoproteinové povahy či látky chemické povahy, které jsou vázány na proteiny. Místem příjmu je kůže, inhalační cesta nebo gastrointestinální trakt. K propuknutí alergické reakce dojde v případě opakovaného kontaktu člověka s antigenem, po kterém se začnou tvořit specifické IgE protilátky, které spouští alergické reakce prvního typu. Alergeny můžeme rozdělit do základních skupin dle výskytu. Jedná se o venkovní alergeny (pyly, spory), vnitřní alergeny (domácí zvířata, roztoči) a potravinové či lékové alergeny [3].

1.2. Alergická reakce

Alergie je nemoc imunitního systému. Poruchy imunitního systému dělíme do třech skupin. První z nich jsou imunodeficitní stavy, které vznikají při poruše protiinfekční obrany a vedou k častému výskytu infekcí. Druhé jsou autoimunitní nemoci, které jsou projevem imunitních reakcí, jsou namířeny proti vlastním tkáním, kdy si tělo proti těmto tkáním vytváří protilátky. Poslední skupinou jsou alergické nemoci [4]. Jedná se o nejčastější imunopatologickou chorobu, která je způsobena neadekvátní reakcí na vnější antigeny. Alergie je reakce časného typu, což znamená, že dostavení se klinických příznaků se dostaví maximálně do několika minut po kontaktu s alergenem. Dochází k ní ale až po navázání histaminu na specifické receptory, z nichž nejdůležitější jsou histaminové receptory, označované jako H1 [5]. Postiženo bývá dýchací ústrojí, kůže, oči, trávicí ústrojí, centrální nervový systém, nebo může dojít k postižení více systémů současně. Intenzita projevu imunitní reakce může mít několik úrovní a může dojít až k ohrožení života. Takto silná reakce se nazývá anafylaktický šok [6].

1.3. Potravinové alergen

Jako každá alergie, i potravinová alergie má imunologický podklad a to zejména ve ztrátě imunologické tolerance vůči složkám stravy, která se projeví v neadekvátní imunitní odpovědi vůči antigenům z potravin. Jsou to látky především bílkovinné povahy, čili proteiny. Alergická reakce vzniká většinou krátce, nebo nejdéle do hodiny po jídle a k jejímu vyprovokování stačí pouze stopové množství potravin. Mezi nejčastější projevy potravinové alergie patří otoky, kožní problémy a problémy s trávicím ústrojím. Klasická potravinová alergie bývá často nesprávně zaměňována za pojmy jako „potravinová intolerance“ nebo „potravinová přecitlivělost“, které ale nemají imunologický základ, čili nezahrnují imunitní reakci organismu na bílkovinnou součást potravy. Příčinou potravinové intolerance jsou nejčastěji enzymové defekty, které se projevují se změnou schopnosti organismu normálně zpracovávat rizikové součásti potravy. Potravinová alergie se dědí. Riziko vzniku potravinové alergie u dětí je asi 50 % v případě nemoci jednoho z rodičů. Pokud jsou alergičtí oba rodiče, riziko je 70-100 % [7-9].

1.4. Zkřížená reakce

Zkřížená alergie vzniká na základě chemicky podobnému složení alergenů. Jedná se o bílkoviny se stejnou biologickou funkcí. Zkřížené reakce se dělí na zkřížené reakce mezi potravinami, zkřížené reakce mezi latexem a potravinou a zkřížené reakce mezi potravinou a inhalačním alergenem (pyly, roztoči). Mezi nejčastější projevy zkřížené alergie patří orální alergický syndrom. Jedná se o pálení rtů, jazyka, otoku úst nebo škrábání v krku. Pokud člověk pokračuje v konzumaci potravin, následky mohou být horší – otok hrtanu, astma, rýma či anafylaxe. Nejčastější zkřížené alergenů nalezneme v Tabulce 1. Podle množství shodných sekvencí aminokyselin se alergenů rozdělují na alergenů homologické a takzvané panalergenů. Ty mohou způsobovat alergickou reakci organismu na ty alergenů, které se nemusí projevit na alergologickém vyšetření, protože nelze prokázat přítomnost IgE látek [10].

Tabulka 1: Zkřížené alergeny [7]

Alergen	Velmi častá zkřížená reakce	Méně častá zkřížená reakce	Předpokládaná zkřížená reakce
Bříza-pyl	líška, jablko, třešeň, broskev, nekratinka, celer, mrkev, petržel, lískové a vlašské ořechy, brambory	habr, jasan, buk, dub, meruňka, švestka, hruška, kiwi, banán, arašíd, mandle, fenykl, kmín, anýz, koriandr	jilm, pelyněk, žito, pšenice, lipnicovité pyly, liči, mango, pomeranč, jedlý kaštan, zelená paprika, špenát, pastináč, řepkový olej, dýně, heřmánek, kari, pepř, sója, pohanka, olivy, med, latex
Lipnicovité pyly	bojínek, jílek, tomka, srha, kostřava, lipnice, rákos, troskut, ovsík, sveřep	pyl žita, pyl ovs, rajská jablka	ječmenný slad
Pelyněk pravý-pyl		ambrózie, mrkev, celer, fenykl, koriandr, kopr, vermuty, absinth, fernet	petržel, paprika, slunečnicová semena, slunečnicový olej, pyl heřmánku, čaj, meloun
Ambrózie-pyl		banán, jablko, medovina, heřmánkový čaj	med, stromové ořechy, celer, slunečnice, meloun, latex
Kukuřice-pyl		pyl ječmene, prosa, ovs	pšenice, rýže, sója
Olivovník-pyl	oliva, jasan, ptačí zob, šeřík, platan		broskev, hruška, kiwi, meloun, stromové ořechy, pyl břízy
Jablko	bříza	třešeň, broskev, celer	hruška, brambory, rajské jablko, trávy, pelyněk, ambrózie

Alergen	Velmi častá zkřížená reakce	Méně častá zkřížená reakce	Předpokládaná zkřížená reakce
Třešeň	bříza	jablko, broskev	
Kiwi	latex, bříza, bojínek	avokádo, banán, lískové ořechy, pelyněk	sezamové semeno, mák, žitná mouka, jílek
Meloun	celer, latex, ambrózie	banán, mrkev, srha, další trávy	jitrocel, okurka, cuketa
Banán	latex	avokádo, kiwi, meloun, bříza	
Mrkev	celer, pelyněk, bříza	petržel, koření	okurka, hlávkový salát, meloun, mango
Celer	mrkev, petržel, koření	červená paprika	okurka, meloun, mango
Cibule		chřest, pór	česnek
Rajské jablko	bříza, pyl žita, bojínek	arašídý, jablko, latex, pelyněk	brambory, celer
Lískové ořechy	pyl lísky, vlašské ořechy	pelyněk, bříza	mák, sezamové semeno, další ořechy, kiwi, broskev, žitná mouka
Arašídý		sója, rajské jablko	čočka, hrách, pelyněk, drnavec
Hrách		bříza	čočka, arašídý, pelyněk
Sója		arašídý, čočka, latex	hrách, fazole, cizrna, ricinový olej, semena, stromové ořechy, potravinářská aditiva luštěninového původu

Alergen	Velmi častá zkřížená reakce	Méně častá zkřížená reakce	Předpokládaná zkřížená reakce
Mák setý		lískové ořechy	semeno hořčice, sezam, kiwi, žitná mouka
Sezam		kiwi, mák, žitná mouka, stromové ořechy	semena hořčice, slunečnice
Oliva		jasmín, ananas, kiwi, meloun, stromové ořechy, bříza	jasan, platan
Koření	fenykl, anýz, kopr, koriandr	bříza, trávy, pelyněk, ambrózie	kmín, bedrník, libeček, kerblík
Kravné mléko	kozí a ovčí mléko	kobylí a buvolí mléko	mléko velblouda, bizona, telecí a hovězí maso
Bílek vejce kura domácího	žloutek	maso kuřecí, slepičí, kachní, husí, peří slepice a husy	peří papouška, holuba, kanára
Treska	tuňák, makrela	sleď, kapr, úhoř	platýs, losos
Měkkýši a korýši	krevety	langusta, krab, humr	chobotnice, oliheň, ústřice, mušle, rak, hlemýžď, sleď, švábi, roztoči
Vepřové maso		kočka domácí (srst, roztoči)	
Latex	avokádo, banán, kiwi, mango, papája, meloun, jedlý kaštan, rajské jablko, fík, fikus	jablko, broskev, ananas, mrkev, celer, kopr, pohanka, citrusy, mučenka, pelyněk	vlašské ořechy, arašídny, hruška, jahody, sója, brambory, oregano, ambrózie, lipnicovité pyly

1.5. Projevy potravinové alergie

1.5.1. Anafylaktická reakce

Anafylaktická reakce neboli anafylaxe je nejzávažnější reakce na alergen, která může nastat. Dojde k přecitlivělé reakci imunitního systému na opakovaný kontakt s určitým alergenem, jíž se účastní specifické protilátky třídy IgE a buňky, které mají schopnost uvolňovat mediátory anafylaxe [9]. Onemocnění postihuje jak děti, tak dospělé osoby. Příznaky anafylaxe začínají u kožních problémů, otoků hrtanu, sníženým krevním tlakem, trávicími problémy a srdeční arytmií. Bez pohotové a rychlé pomoci může tento stav končit až smrtí z důvodu selhání krevního oběhu. Ze všech případů anafylaxe je 33-50 % způsobeno právě alergeny obsaženými v potravinách [11].

1.5.2. Orálně alergický syndrom

Orálně alergický syndrom (OAS) je mírnější projev organismu na alergen. Tento syndrom se projeví okamžitě po požití potraviny, která je ve většině případů rostlinného původu, ale výjimkou není reakce ani po požití alergenu živočišného původu [9]. Mezi hlavní symptomy patří pálivý pocit v ústech, svědění rtů a jazyka, porucha polykání a dušnost. Většinou se jedná pouze o tyto příznaky, ale může se také vyskytnout i život ohrožující otok hrdla nebo může reakce vyústit v anafylaktickou reakci [12].

1.5.3. Kožní příznaky

Kožní příznaky jsou nejčastějšími projevy potravinových alergií. U dětí se jedná až o 80 % případů. První rozšířený kožní příznak je kopřivka. Svůj název získala díky tomu, jak vypadá na kůži. Zarudnutí kůže s bílými pupínky se totiž podobá stavu, když se člověk spálí o kopřivu. Kopřivku dělíme na akutní a chronickou, kdy akutní postihuje hlavně děti a trvá několik hodin až dnů. U chronického průběhu postihuje především dospělé osoby a trvá týdny až měsíce. Druhým kožním příznakem je atopický ekzém, jinak nazývaný jako atopická dermatitida nebo neurodermatitida. Jedná se o vyrážku, která postihuje nejčastěji tvář, poté zápěstí, loketní a podkolení jamky ale výjimkou není postižení celého těla. Průběh onemocnění je chronický. V místech, kde se ekzém vyskytuje, má člověk hrubou, světlou a vysušenou pokožku. Při škrábání se kůže odlupuje a je zde riziko vnášení druhotné infekce do rány [9].

1.5.4. Respirační příznaky

Prvním respiračním příznakem je alergické astma. Jedná se o onemocnění dýchacích cest a plic. Dochází k zúžení některých částí dýchací soustavy a dochází tak k omezení dýchání. Projevuje se dráždivým kašlem nebo dušností po výdechu. Dochází přitom k degradaci plicní tkáně a tím zatížení nejen dýchacího systému, ale také k zatížení srdce. Jen málokdy je alergické astma jediným projevem alergické reakce, obvykle se jedná o jev přidružený. Dalším respiračním příznakem je alergická rýma, často označována jako senná rýma. Projevuje se jako výtok z nosu, společně se svěděním a pálením uvnitř nosu, nosní sliznice je červená a zduřelá, tím pádem je omezena schopnost dýchání. Posledním častým respiračním příznakem je otok neboli edém hrtanu. Jde o zduření hrtanu či jazyka, což způsobuje kompletní neprůchodnost horních dýchacích cest, což může vést k udušení [9].

1.5.5. Gastrointestinální příznaky - GIT

Prvním z nich je nauzea, neboli nevolnost, což je stav, který předchází zvracení. Dále průjem, břišní křeče a kolikovitá bolest břicha [9].

1.6. Legislativa

Evropská unie vydala nařízení č. 1169/2011 o poskytování informací spotřebitelům. Toto nařízení stanovuje povinnost poskytnout spotřebitelům informace o alergenních látkách, které byly použity při výrobě potraviny nebo produktu. Tato povinnost se vztahuje na 14 základních alergenních složek, které jsou k dispozici na obrázku číslo 1. Toto nařízení platilo dříve pouze pro balené potraviny. Od 13. 12. 2014 však musí být informace o alergenech uváděna i u nebalených potravin a u potravin zabalených bez přítomnosti spotřebitele. Tato povinnost samozřejmě spadá i na majitele restaurací, jídelen, fast foodů, pouličních stánků a jiných stravovacích zařízení [2].

SEZNAM ALERGENŮ

publikovaný ve směrnici 2000/89 ES od 13.12.2014 směrnici 1169/2011 EU



Obrázek 1: Rozdělení alergenů v potravinách podle nařízení č. 1169/2011 [2]

1.7. Značení alergenů na obalech a u pokrmů

Alergenní složky se musí značit nejen na obalech hotových výrobků, ale také u všech nebalených potravin. Informační povinnost se dle legislativy vztahuje na 14 skupin alergenů, které jsou vyobrazené na Obrázku 1. U balených výrobků nalezneme informace o obsažených alergenních látkách ve složení, kdy název alergenní látky musí být zvýrazněn, aby byl odlišen od ostatních složek. Nejčastěji se zvýraznění provádí stylem písma (velká písmena, podtržení textu, tučné písmo, kurzíva není dostatečná) nebo podbarvením textu. Pokud není na obale uvedeno složení výrobku, alergenní složky musí být uvedeny za slovem „obsahuje“. Výjimku tvoří, pokud je název alergenní složky přímo obsažen v názvu výrobku. Pokud se jedná o nebalené výrobky, seznam alergenních složek musí být v blízkosti místa nabídky (na pultu, cedulka přímo u výrobku). Pokud prodávající zabalí výrobek na místě prodeje bez přítomnosti spotřebitele, musí být alergenní složky značeny na obal výrobku. To samé platí také

v restauracích, rychlých občerstveních a jídelnách. Seznam alergenů musí být písemně vystaven například přímo v nabídce, jídelních lístcích nebo ho musí majitel provozovny předložit na vyzvání spotřebitele [2].

Na obalech výrobků se můžeme setkat s větou typu: „Může obsahovat ...“. Nejčastěji se v této větě objevují arašídy, skořápkové plody či lepek. Jedná se o preventivní opatření, které poskytuje výrobce. Cílem tohoto preventivního značení je upozornit na riziko nezáměrné kontaminace. Jedinci se poté mohou takovým potravinám také vyhnout a předcházet tak nechtěné alergické reakci. Preventivní označení má své výhody a nevýhody. Výhody jsem zmínila výše, ale nevýhodou je poté malá rozmanitost stravy osob trpících alergií nebo intolerancí. Podle výzkumu v roce 2010 se ukázalo, že 94 % preventivních opatření je negativních a potraviny žádnou z avizovaných složek neobsahovaly [2].

1.8. Jednotlivé skupiny alergenů podléhající legislativě

1.8.1. Obiloviny obsahující lepek

První velice rozsáhlou skupinou alergenů jsou obiloviny, které obsahují lepek. Každé obilné zrno se skládá ze tří částí. První z nich je obal neboli povrchová vrstva, která obsahuje nestrávitelnou vlákninu, vitamíny, minerály a stopové prvky. V druhé části nalezneme bílkovinný obsah, což je především lepek, odborně nazývaný gluten. Gluten opět dělíme na dvě složky, gliadin a glutenin. Gliadin patří do skupiny prolaminů a u každého druhu obilí je popsán jiným názvem, který nalezneme v Tabulce 2. Poslední částí obilného zrna je klíček, který obsahuje vysoký obsah tuku [12].

Tabulka 2: Názvy prolaminů v obilí [12]

Žito	Ječmen	Oves
sekalin	hordein	avenin

Lepek je v organismu štěpen působením trávicích enzymů, která rozkládají bílkoviny na menší části – peptidy. Tyto vzniklé peptidy pak u predisponovaných osob vyvolávají specifickou imunitní odpověď střevní sliznice, která vede k nepřetržité tvorbě určitých protilátek. Opakovaná konzumace alergizující potraviny vede k zánětu střevní sliznice, popřípadě až k její atrofii (zmenšení) s následným narušením schopnosti trávení potravin.

Příznakem a projevem alergií na lepek může být průjem, zvracení, svědivá vyrážka na pokožce (především na loktech, kolenou, hýždích a ramenech), křeče, únava, bolest kloubů i výrazné zhubnutí. Nesnášenlivost lepku se může projevit alergií na lepek, celiakií nebo Duhringovou dermatitidou, což je druh celiakie s kožními projevy onemocnění. U celiakie je reakce po požití lepku, a to i ve stopovém množství bezprostřední a rychlá. U intolerance je pomalejší, nenápadnější a člověk o ní nemusí vůbec vědět. Nesnášenlivost lepku je v současné době nevyléčitelné onemocnění, pro které existuje jediné řešení a to je dodržování bezlepkové diety. Musí si dávat velký pozor na složení potravin. Nejčastější potraviny, které obsahují lepek, je pečivo vyrobené z pšeničné, žitné nebo ovesné mouky. Dále také ovesné vločky, kroupy, cukrářské výrobky, uzeniny, omáčky a jiné. Bezlepkové potraviny se značí nejčastěji logem přeškrtnutého klasu nebo slovně „přirozeně bezlepkové“ [13-14].

1.8.2. Korýši

Další rozsáhlou skupinou jsou korýši. Mezi korýše řadíme například kraby, humry, garnáty, langusty a raky. Výskyt alergie je největší v oblastech, kde se korýši nejčastěji konzumují (Japonsko, Španělsko, Řecko, Itálie) a dosahuje 2 % z tamní populace [14]. U korýšů byly dobře popsány hlavní alergeny, ale jinak obsahují celou řadu alergenů, které byly sledovány pouze u malé skupiny lidí. Hlavním alergenem je svalová bílkovina korýšů – tropomyosin, respektive celá skupina tropomyosinů, které si jsou hodně podobné. Důsledkem jsou zkřížené reakce. Tropomyosin je u různých druhů korýšů značen jiným kódem, jako nalezneme v Tabulce 3. Tropomyosin je tepelně odolný a proto ani tepelná úprava korýšů nepomůže zbavení se alergenity. Odolnost vykazuje také proti nízkému pH a trávicím enzymům. Je velká pravděpodobnost, že pokud má jedinec alergii na jeden druh korýše, alergie se objeví také u ostatních druhů. Alergie zůstává na celý život a nemění se s věkem. Příznaky této alergie jsou nejčastěji kožní problémy, ale mohou se vyskytnout i problémy s dýchacím a trávicím ústrojím. Protein může vyvolat i anafylaxi [15].

Tabulka 3: Přehled koryšů a kódů jejich tropomyosinů [14]

Druh koryše	Kód tropomyosinu
Krevety a ostatní garnáti	Pen a 1, Pen i 1, Pen m 1, Met e 1, Par f 1, Mel e 1, Crac c tropomyosin
Krabi	Cha f 1, Can p tropomyosin
Humři, langusty	Pan 1 s, Hom a 1
Raci	Ast f

1.8.3. Vejce

Alergie na vejce je častá alergie raného věku dítěte, která mizí nejpozději kolem desátého roku života. Vzhledem k podobnosti alergenních bílkovin může být při alergii na vejce přítomná také alergie na mléko. Každé vejce je tvořeno z 56-61 % bílkem a z 27-32 % žloutkem. Bílek obsahuje až 10 % bílkovin, zbytek je voda. Žloutek obsahuje především tuky, v převaze jsou nasycené mastné kyseliny. Dále vejce obsahuje také vitamíny (A, E, B2, B12), železo a lecitin. Bílek je více alergenní než žloutek a přehled základních alergenů nalezneme v Tabulce 4 [14].

Tabulka 4: Základní alergeny ve vejcích [14]

Žloutek	Bílek	Žloutek+bílek
alfa-livetin	ovomukoid	kasein kináza
fosfitin	ovalbumin	apovitellin
	ovotransferin	
	lyzozym	
	ovoglobulin	
	ovomucin	

Hlavní alergenní složky bílku (ovomukoid, ovalbumin, ovotransferin) ztrácí tepelnou úpravou nad 60°C část své alergenity. Alergie na hlavní složky žloutku (livetiny) jsou vzácné. Problémem vaječných alergií je dá se říci jejich všudypřítomnost. Vyskytují se ve spoustě druhů potravin jako tzv. skryté alergeny. Jedná se o potraviny jako těstoviny, majonézy, koláče, sušenky a další. Alergeny bílku mohou vyvolat zkříženou reakci mezi jednotlivými druhy drůbežím vajec – slepičí, husí, křepelčí nebo kachní. Příznaky alergie začínají zvracením, bolestmi břicha, průjmem. Můžou ale končit až anafylaktickým šokem [16].

1.8.4. Ryby

Hlavním alergenem u ryb je protein, který tvoří hlavně složku bílé svaloviny ryb – parvalbumin. Tato bílkovina je velmi stabilní a je odolná vůči tepelnému zpracování i trávicím enzymům. Nejlépe probádané parvalbuminy u jednotlivých druhů ryb nalezneme v Tabulce 5. Pokud je člověk na ryby alergický, pravděpodobnost vymizení alergie je minimální. Alergická reakce se může dostavit ihned do 1 minuty až do 48 hodin. Nejméně vážné příznaky se začínají projevovat na kůži, dále to jsou problémy s trávicím ústrojím a může končit až anafylaktickým šokem [14].

Tabulka 5: Nejlépe probádané parvalbuminy [14]

Druh ryby	Alergen
Treska	Cad c 1, Cad m 1
Losos	Sal s 1
Tuňák	Thu a1, Thu o 1, Thu to 1
Makrela	Scp s 1, Sco a 1, Sco j 1
Platýz	Hip h 1
Sled'	Clu h 1
Sardinka	Sar m 1
Kapr	Cyp c 1
Úhoř	Ang a 1

1.8.5. Jádra podzemnice olejn  (arařidy)

Nebezpečnou skupinou alergenů jsou arařidy neboli bursk  ořechy. Jedná se o luřt ninu – podzemnici olejnou, kter  patří do čeledi bobovitých [14]. Arařidov  alergeny nepodléhají tepeln  úpravě – prařen  – dokonce díky zvl stn m chemick m reakcím nastavuje podmínky ke vzniku alergenů nových. Alergii na arařidy klasifikujeme jako celozivotn . Mezi proteiny podzemnice olejn  patří globuliny, kter  jsou rozpustn  v soln m roztoku a albuminy, kter  jsou rozpustn  ve vodě. Arařidov ch bílkovin, které mohou vyvolat alergii, je popsáno jedenáct a jejich přehled nalezneme v Tabulce 6. U vřech z nich je více či méně zn m  zkř iřen  alergie [17].

Tabulka 6: Přehled alergenů arařidů [14]

Kód alergenů	Zařazen�
Ara h 1	7S globulin – vicilin
Ara h 2	2S albumin – konglutin
Ara h 3	11S globulin – legumin
Ara h 4	11S globulin – legumin
Ara h 5	Bet v 2 homologie – profilin
Ara h 6	2S albumin – konglutin
Ara h 7	2S albumin – konglutin
Ara h 8	Bet v 1 homologie
Ara h LTP	LTP homologie
Ara h oleosin	homologie se sezamem (ses i 4, ses i 5)
Ara h aglutinin	homologie se sójou

U arařidů představují velk  problémy jejich skryt  alergeny, kterých je celá řada. Jedná se například o sladkosti, margaríny, másla, marcip ny a zvl stř pozor si musí lid  d t na cizí

kuchyně, jako je čínská, thajská nebo vietnamská. Mezi příznaky alergie patří dýchací obtíže, otoky obličeje a u osob citlivějších až anafylaktický šok [17].

1.8.6. Sójové boby – sója

Sója se řadí mezi luštěniny z čeledi bobovitých. Sója obsahuje 38 % bílkovin, 30 % sacharidů, 20 % tuků a 10 % vlákniny. Dále je zdrojem cenných aminokyselin a nenasycených tuků. Zároveň ale postrádá vitaminy C a B12 a má zjevný nedostatek vápníku, fosforu a zinku [16]. Konzumace sóji je oblíbená především u vegetariánů, kde do jisté míry nahrazuje masné výrobky s bohatým obsahem bílkovin, i když nikdy absolutně nenahradí bílkoviny živočišného původu. Dosud známé alergeny sóji nalezneme v Tabulce 7. Sója se používá na výrobu dalších potravin, jako jsou sýr, tvaroh, omáčky, mléko, jogurt nebo mouka. Sója je dnes tak rozšířená, že se může vyskytovat prakticky v každé potravíně, která je vyráběna průmyslově. Proto každý alergik musí pečlivě číst etikety [17]. V tabulce číslo 7, nalezneme přehled dosud známých alergenů sóji s jejich základními funkcemi. Sója je příčinou zhoršení atopického ekzému a to především u dětí. Alergeny mohou způsobit těžkou až fatální anafylaktickou reakci. Nejčastěji k tomuto stavu dochází při nevědomém požití sóji například v masných výrobcích, kořeních, rybích konzervách a pizzách. V označeních na etiketách totiž obsah sóji nenalezneme, ale svou podstatou sóju může obsahovat. Sója je opravdu hodně rozšířená a proto by si měl sójový alergik dávat pozor na spoustu věcí jako je třeba monosodium glutamát sodný, který se používá jako dochucovadlo. Získává se totiž ze sóje. Další skupinou jsou nepotravinové výrobky, jako je kosmetika (mýdla, mléka, krémy) nebo textilie [14].

Tabulka 7: Známé alergeny sóji s jejich základními funkcemi [14]

Alergen	Funkce
Cly m 1, Cly m 2	-
Cly m 2S albumin	2S albuminy – konglutiny či konglutininy
Cly m 3	Profilin
Cly m 4	Bet v 1 homologie
Cly m glycininy	Zásobní bílkoviny, jde o 11S globuliny
Cly m Bd28K	Viciliny (zásobní bílkoviny)
Cly m lectin	Lektiny
Cly m trypsin inhibitor	Alfa-amylázy/trypsin inhibitory
Cly m Bd30K	Proteinázy

1.8.7. Mléko

Alergie na mléko je jednou z nejrozšířenějších v populaci. Často ale bývá zaměňována s intolerancí na laktózu. Rozdíl je v tom, že při intoleranci má člověk zažívací potíže, ale tento stav v řádu hodin či minut pomine. Není zprostředkována imunitním systémem, jedná se o deficit enzymu laktázy, který štěpí mléčný cukr laktózu. Intolerancí trpí až 20 % populace v České republice. Naopak projevy alergie jsou skutečné nemoci, které mohou trvat i několik dní. V našich krajích se jedná především o alergii na kravské mléko, což má historický podtext. Proto se budeme zabírat především mlékem kravským. Alergie se často projevuje u dětí a mizí do tří let života. Děti mají nezralý imunitní systém, trávicí trakt a střevní mikroflóru a při kojení se vyskytuje z toho důvodu, že matka konzumuje výrobky z kravského mléka neomezeně a přechází tak právě do mateřského mléka. Další možností je, že se alergie rozvine až kolem půl roka života, kdy dítě začne konzumovat klasické mléko, jogurty, kaše. U dospělých se příliš nevyskytuje a převládá u nich právě intolerance [18]. Kravské mléko obsahuje celou řadu proteinů a 80 % z nich tvoří kaseiny a zbytek, čili 20 % proteiny syrovátky. Kasein jako hlavní alergen je termostabilní a proto nepodléhá zahřátí. Některé studie dokonce ukazují, že se

alergenita může zahřátím zvýšit [14]. Oproti bílkovinám syrovátky je odolnější i vůči vlastnímu trávení. Alergie je celoživotní. Syrovátka kravského mléka je tvořena alfa-laktalbuminem, beta-laktoglobulinem a hovězím sérovým albuminem. Ukázalo se, že mnoho lidí je alergických na více, než jeden protein mléka. Ve většině případů mají lidé alergickou reakci také na další druhy mlék, jako kozí mléko, ovčí mléko a výrobky z nich. Mezi projevy alergie na kravské mléko patří kožní projevy, prudké zvracení, polykací obtíže, průjemy a vzácně také anafylaktické reakce. Má také význam ve vzniku a průběhu chronických onemocnění jako je atopický ekzém nebo chronické střevní záněty [17].

1.8.8. Skořápkové plody

Dostáváme se k další skupině, jejíž souhrnný název jsou skořápkové plody. Do této kategorie řadíme spoustu druhů ořechů, kromě arašídů, což jsou luštěniny a více jsem se jim věnovala v kapitole 1.6.5. Skupinu skořápkových plodů můžeme následně rozdělit na dvě další rozsáhlé skupiny. První z nich jsou stromové ořechy, kam řadíme vlašské ořechy, pekanové ořechy, lískové ořechy, para ořechy, kešu, pistácie a mandle. Mandle můžeme zařadit také mezi peckoviny. Druhá skupina jsou takzvané ořechy nepravé. Jedná se o kokosový ořech, muškátový oříšek a také piniové ořechy, které se ale někdy řadí spíše mezi semena [14]. Alergie na ořechy je jednou z nejčastějších a také bývá alergií celoživotní. Pokud je jedinec alergický na jeden druh skořápkového plodu, je velká pravděpodobnost, že se časem projeví také alergie na další skořápkové plody. S ořechy se lze setkat v běžných potravinách, jako jsou pekárenské a cukrářské výrobky, ale člověk si musí dát pozor také na výběr kosmetiky a při chovu domácích mazlíčků. Odpovědí na alergii je dermatitida, dýchací obtíže, svědění a otoky obličeje a kůže [19]. V Tabulce 8 nalezneme seznam hlavních alergenů v různých druzích stromových ořechů [14].

Tabulka 8: Seznam hlavních alergenů v různých druzích stromových ořechů [14]

Vlašský ořech	Pekanový ořech	Lískový ořech	Para ořech	Kešu	Pistácie	Mandle
Albumin	albumin	Legumin	Albumin	Legumin	Pis v	Albumin
Vicilin		Vicilin	Legumin	Vicilin		Profilin
LTP		LTP		Albumin		Amandin
Profilin		Bet 1				Conglutin
Leguminy		Bet 2				LTP

1.8.9. Celer

Celer patří do čeledi miříkovitých, stejně jako mrkev, petržel, pastinák, anýz, fenykl nebo koriandr. Někdy můžeme místo miříkovitých nalézt označení okoličnaté [15]. Rostlina se skládá ze dvou částí, kořene a stonku, kdy se alergie vyskytuje především na kořen [17]. Alergeny v celeru, jsou značené jako Api g 1 a Api g 4. Jsou tepelně odolné, takže vaření ani zmrazení jeho alergenitu nesníží. Významná je zkřížená reakce s pyly, především s pyly břízy a pelyňku. Alergie na celer se projevuje kopřivkou, orálním alergickým syndromem a v krajních případech také anafylaktickou reakcí [18].

1.8.10. Hořčice

Hořčice patří do čeledi brukvovitých bylin, stejně jako brokolice, kapusta, květák, křen či řepka [16]. Hořčice se jako potravinový výrobek připravuje ze semen hořčičných rostlin. Existuje spousta různých druhů hořčice, které obsahují různé alergeny, které se značí jako Bra j 1, Bra n 1 a Sin a 1 [14]. Při alergii musíme vyřadit všechny druhy hořčice například plnotučnou, dijonskou, kremžskou a jiné. Hořčice je také bohatým zdrojem antioxidantů, vitamínu (A, B, C, K) a řady minerálů. Mezi projevy patří dýchací problémy, otoky hrdla, nevolnost, kopřivka a v neposlední řadě také anafylaktický šok [18].

1.8.11. Sezamová semena

Alergie na sezamová semena je na vzestupu, jelikož ho do své stravy zařazuje čím dál tím více lidí a to ve formě právě sezamových semen, nebo sezamového oleje. Ve většině případů začíná již v dětství jako důsledek přenosu sezamu v mateřském mléce. Obsahuje velké množství vitamínů a prvků, které napomáhají správnému fungování organismu (fosfor, železo, vápník). Sezam je jednoletá bylina, která patří do čeledi sezamovitých [18]. Hlavní alergeny jsou 2S albuminy, přesněji Ses i 1 a Ses i 2 a. Existuje více druhů sezamu, ale jejich alergenita je srovnatelná. Člověk trpící alergií si musí dávat pozor na to, co konzumuje a zda se nemůže produkt setkat při výrobě se sezamovým semenem, což by způsobilo skrytou alergii. Pro prudce reagující alergiky představuje nebezpečí také kosmetika, medicínské masti nebo krmiva pro domácí mazlíčky. Negativní reakce může nastat také při dlouhodobém pobytu v jeho přítomnosti. Tím trpí především pekaři a cukráři. Příznaky alergie na sezam jsou kopřivka, otok rtů a jazyka, rýma a v krajních mezích anafylaktický šok [20].

1.8.12. Oxid siřičitý a siřičitany

Siřičitany jsou hodně rozšířené, protože se, jednoduše řečeno, vyskytují všude kolem nás. Obsahuje je jak lidské tělo, tak vzduch, potraviny a jiné. V lidském těle vznikají na základě katabolického zpracování sloučenin, které obsahují síru, především cystein, methionin a aminokyseliny. Dalším významným místem výskytu jsou právě potraviny. Do potravin jsou uměle dodávány a plní v nich řadu praktických vlastností. Prvním z nich je inhibice enzymového hnědnutí, především u čerstvého ovoce a zeleniny a neenzymové hnědnutí u sušených potravin. Vykazují antimikrobiální aktivitu, zlepšují vlastnosti těst a působí jako pomocný prostředek. Mezi širokou veřejností jsou známy jako takzvané „éčka“ a tak jsou také označovány na obalech výrobků. Ty z nich, které mají E-kód nalezneme v Tabulce 9 [14].

Tabulka 9: Přehled označení siřičitanů jejich E-kódem [14]

E-kód	Chemické názvosloví
E 220	Oxid siřičitý
E 221	Siřičitan sodný
E 222	Hydrogenuhličitan sodný
E 223	Disiřičitan sodný
E 224	Siřičitan draselný
E 226	Siřičitan vápenatý
E 227	Hydrogensiřičitan vápenatý
E 228	Hydrogensiřičitan sodný

Obsah siřičitanů v potravinách je rozdílný a pohybuje se od 10 mg/kg do 1000 mg/kg. Nejméně jich nalezneme v rosolech, zmrazených těstech, dále v nakládané zelenině, vinném octu a nejvyšší hodnoty nalezneme v sušeném ovoci nebo víně. Na potravinách se musí značit pouze v případě, že množství přesáhne 10 mg/kg [14].

1.8.13. Vlčí bob – lupina

Lupina má český alternativní název a to vlčí bob mnoholistý. Jedná se o jednoletou nebo trvalou bylinu, občas keřovitou rostlinu, která patří do skupiny bobovitých. Můžeme ji řadit také do skupiny luštěnin. Dorůstá až do výšky jednoho metru a má pestře zbarvené květy. Bylina je vyšlechtěna právě pro potravinářské účely a může se konzumovat pouze tepelně opracovaná, do té doby je pro člověka jedovatá. Představuje alternativu k mnohem známější a používanější sóje, která je ovšem také významným alergenem [21]. Je zdrojem velkého množství proteinů, které způsobují alergii, dále obsahuje živiny a rozpustnou vlákninu. Alergenitu u lupiny může snižovat proces takzvané extruze. Jedná se o technologický proces zpracování potravin, kdy se alergeny tepelně upravují kombinací tlaku, tepla a mechanické síly. Lupinu nalezneme ve velkém množství potravin, jako jsou pekařské produkty, masné výrobky

a tak podobně. Příznaky alergie jsou obdobné jako u ostatních alergenů, čili drobné kožní problémy, otoky až po anafylaktický šok [22].

1.8.14. Měkkýši

Mezi zástupce měkkýšů řadíme například slávky jedlé, chobotnice, sépie, ústřice a další. Jsou hodně podobné skupině korýšů, které jsem rozebrala v kapitole 1.6.2. Mají stejnou alergenní látku, tropomyosin. Jedná se o panalergen, který je obsažen ve svalové tkáni, kde se účastní jejího stahu. U nesvalových tkání rozhoduje o tvaru buňky. Z hlediska snadnější dostupnosti těchto mořských živočichů je výskyt alergie častější, než tomu bylo v přechodných letech. Nejrozšířenější druhy měkkýšů a jejich hlavní alergeny jsou vyobrazeny v Tabulce 10. Mezi příznaky alergie patří otoky, kopřivka, problémy s trávicím ústrojím a v krajních mezích anafylaktický šok [14].

Tabulka 10: Nejznámější měkkýši s jejich hlavní alergenní látkou [14]

Měkkýši	Alergeny
Ústřice	Cra g 1
Různé druhy mušlí	Tur c 1, Per v 1, Hal d 1
Škeble-například slávka jedlá	Myt e tropomyosin, Pug t tropomyosin, Lut p tropomyosin, Pat y tropomyosin, Pin e tropomyosin
Oliheň	Tod p 1
Chobotnice	Oct v tropomyosin, Sep m tropomyosin, Lol e tropomyosin
Sépie	Sep m tropomyosin, Lol e tropomyosin

2 Analytické metody stanovení alergenů v potravinách

V následující kapitole je zpracována rešerše zabývající se možnostmi analytického stanovení jednotlivých skupin potravinových alergenů dle legislativy. Z hlediska rozsahu bakalářské práce jsou popsány analytické metody pouze pro prvních sedm skupin alergenů.

2.1. Lepek

Měření lepku v potravinách je dáno odbornou normou ČSN 46 1011, která má celkem 29 částí. O stanovení lepku pojednává její devátá část, čili norma ČSN 46 1011-9, která kromě stanovení lepku v obilovinách, pojednává také o stanovení lepku u luštěnin a olejnin. Při všech stanoveních musí být dodrženy bezpečnostní předpisy podle norem ČSN 01 8003 a ČSN 65 0201 [23].

Hojně využívanou metodou na stanovení lepku je fluorescenční spektroskopie [24]. Tato metoda je založená na citlivosti fluoroforů vůči jejich prostředí [25]. Fluorescence je sekundární záření, které vydává látka po absorpci elektromagnetického záření. Každá fluoreskující molekula má dvě charakteristická spektra: emisní a excitační. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce budícího záření. Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření. K měření se používá konvenční fluorescenční spektrometr, který jako excitační zdroj obsahuje vysokotlakou xenonovou výbojku. Dále obsahuje excitační a emisní monochromátor, díky kterému je vybraná potřebná vlnová délka. Difrakčním prvkem v monochromátorech je mřížka. Záření je detekováno fotonásobičem, který převede informaci záření na elektrický proud úměrný intenzitě světla. Signál se zesiluje vhodnými elektronickými zařízeními. Výstupem klasického fluorescenčního spektroskopu jsou právě emisní a excitační spektra. Koncentrace látky ze vzorku se zjišťuje z kalibrační křivky [26]. Vzorek k analýze se připravuje z mouky, která se zahřívá při různých teplotách a časech. Guerrieri a kolektiv zahřívali mouku při teplotě 45°C po dobu 1 hodiny a dále zvyšovali teplotu až na 110°C po dobu 18 hodin. Poté byl vzorek lyofilizován (vysušen mrazem). Ze směsi byl lepek ručně vymýván vodou a poté ponechán 30 minut v klidu. Gluten byl poté analyzován v roztoku kyseliny octové. Obsah glutenu ve vzorku se pohyboval od 84,3-85,3 % při zahřívací teplotě 45°C a 88,3 % při zahřívání na 110°C [27]. Ahmad a kolektiv porovnávali obsah lepku v mouce obsahující lepek s komerčně dostupnou bezlepkovou moukou. Vytvořili vzorky s rozdílnými poměry pšeničné a bezlepkové mouky, čili s rozdílným obsahem lepku. Připravili 94 různých

vzorků, které poté použili k analýze. Lepek poté vykazoval absorpční a emisní maxima při excitační vlnové délce 270-290 nm a emisní vlnové délce 430-490 nm. Obsah lepku ve vzorcích se pohyboval od 27,9-29,6 %. Touto metodou dokážeme stanovit nízké hladiny lepku v potravině, stanovení je ale zatíženo chybou do 10 %, což není vhodné pro pacienty s celiakií, tudíž se metoda nepovažuje za plně spolehlivou [24]. Ahmad a kolektiv v jiném experimentu použili dvanáct různých kultivarů obilí, ze kterých byla připravena mouka. Po mletí byla mouka skladována v chladicích boxech, aby se zabránilo změnám ve složení mouky. Z mouky byly připraveny směsi pro přípravu chleba. Skládaly se z 2 % soli, 1 % cukru, 2 % tuku, 1 % suchého droždí na základě hmotnosti mouky a vody. Tato směs poté byla po upečení analyzována. Měření probíhalo za stejných podmínek jako v prvním případě. Obsah lepku se pohyboval od 21,56-35,82 %. Výsledky jsou opět zatíženy chybou do 10 % [28].

Další možností je stanovení pomocí jednorázového elektrochemického senzoru. Tento senzor se zaměřuje především na gliadinový imunodominantní peptid, který způsobuje celiakii. Minimum lepku, které může tento senzor stanovit je 0,113 μg gliadinu L-1, což odpovídá 380 mg/kg glutenu v potravinách [22].

Hojně využívanou elektrochemickou metodou je diferenční pulzní voltametrie (DPV) [29]. Jedná se o metodu, kde se používají elektrochemické články, neboli elektrolyzéry, které jsou tvořeny pracovní polarizovatelnou a referenční nepolarizovatelnou elektrodou. Pracovní elektroda u voltametrie je visící kapková rtuťová elektroda, která má neměnný povrch. Měří se závislost proudu protékajícího pracovní elektrodou na potenciálu měnící se s časem, který je na ni vkládán. Rozdílná aplikace napěťového pulzu a rozdílná registrace proudové odezvy dělí voltametrii na dva typy. Na stanovení lepku se používá diferenčně pulzní voltametrie. U této metody je napěťový pulz aplikován ke konci života kapky, přičemž celková doba kapky je řízena elektronicky klepátkem. Zapisuje se rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulzu a na jeho konci. Závislost rozdílu proudů na potenciálu prochází maximem a má tvar píku. Poloha píků na potenciálové ose je dána kvalitou analytu, jeho výška je dána jeho koncentrací [30]. Tato metoda se při stanovení lepku používá především u vzorků mouky. Mouka se používá v takovém stavu, v jakém ji známe, čili sypká, nebo se může udělat její vodný roztok [31]. Detekční limit pro tuto metodu byl stanoven na 7,11 $\mu\text{g/ml}$. Eksin a kolektiv při stanovení použili argentochloridovou (stříbrný drátek pokrytý vrstvou Ag/AgCl v roztoku KCl) referenční elektrodu a platinovou pomocnou elektrodou. Pšeničný lepek zakoupili od firmy Sigma. Pro přípravu standardního roztoku se gluten rozpustil v dimethylsulfoxidu pomocí ultrazvuku. Analyzovány byly vzorky komerčně dostupné bezlepkové mouky a pšeničná mouka obsahující

lepek. Množství lepku bylo vypočteno z výšky píku. Zjištěný obsah lepku v pšeničné mouce se blížil deklarovanému množství lepku uvedenému na obalu (60 µg/ml) a bylo stanoveno na 62,08 µg/ml [29].

Komerčně dostupné jsou JET (jednoduchý enzymatický test) sady. Jedná se o test, který se používá na detekci lepku v tepelně neupravených potravinách. Tento test je založený na reakci specifických protilátek s gliadinem v extraktu potravin. Výsledek je interpretován ve formě negativního nebo podezřelého (patrně obsahuje gluten) vzorku. Hranice positivity z tohoto testu je 20 mg/l potravin. Hodnocení je založeno na vizuálním porovnání zbarvení modrého roztoku. Negativní roztok nemá žádné zbarvení [31].

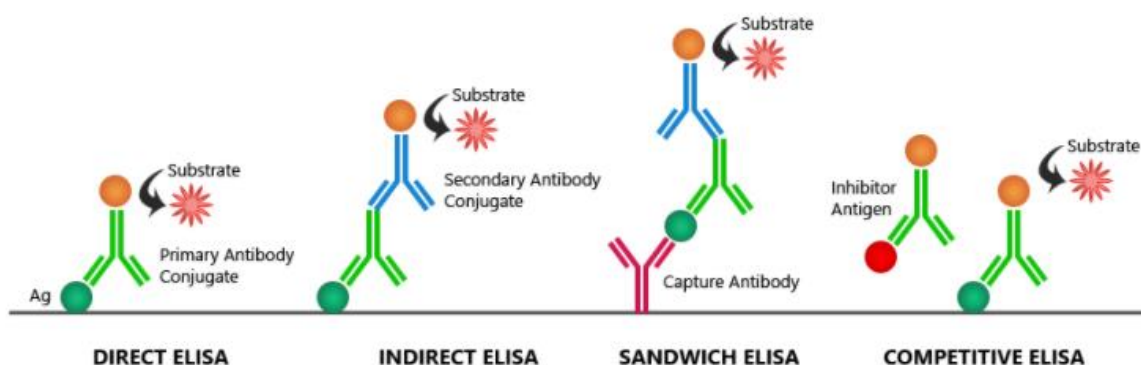
2.2. Tropomyosin u koryšů

Ve srovnání s ostatními potravinovými alergeny jsou koryši málo probádanou skupinou. Důvodem je velké množství druhů koryšů. Pro účely stanovení musíme zvolit, zda se má jednat o druh, skupinu či podskupinu. Nejčastějším způsobem stanovení je nepřímá sendvičová ELISA. ELISA je zkratka odvozená od anglického enzyme-linked immuno sorbent assay, česky volně přeloženo jako enzymimunoanalýza. ELISA je obecně biochemická metoda užívaná v imunologii k detekci a stanovení přítomnosti určité protilátky či antigenu ve vzorku. Tyto metody jsou komerčně dostupné pro spoustu alergenů, kdy jejich hlavními výhodami jsou snadná manipulace a relativně krátká doba analýzy. Jednu komerčně dostupnou sadu můžeme vidět na Obrázku 2. Tzv. kity fungují pouze pro stanovení jednoho alergenu. Pokud tedy chceme vzorek testovat na více alergenů, značně se prodlužuje čas a zvyšují se náklady, protože pro každý alergen musíme použít odlišný kit. Další velkou nevýhodou ELISA kitů je jejich špatná srovnatelnost, protože využívají látky s odlišnou specifičností a mohou se tak vyskytnout špatné pozitivní výsledky z důvodu zkřížených reakcí [32].



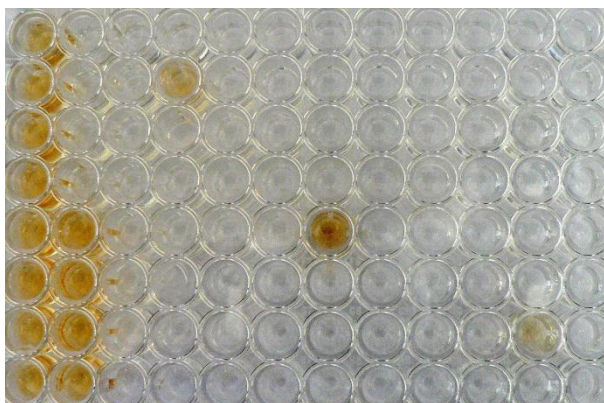
Obrázek 2: Komerčně dostupné ELISA kity [33]

Mezi základní druhy patří přímá, nepřímá a sendvičová metoda ELISA. Sendvičová metoda, která nás zajímá z hlediska použití u koryšů, se taktéž dělí na přímou a nepřímou. Základní průběh jednotlivých metod nalezneme na Obrázku 3.



Obrázek 3: ELISA metody [34]

Přímá metoda začíná pasivním navázáním protilátky na pevný povrch. Antigeny jsou ředěny v blokujícím pufru, aby se zamezilo nespecifickému navázání. Po inkubaci a promývání vzniká stabilní komplex (antigen-protilátkový). Po odstranění nenavázaného materiálu si stanoví množství navázaného antigenu pomocí enzymem značené protilátky, která je namířena proti druhé antigenní determinantě na stejném antigenu. Po druhé inkubaci a separaci nenavázaného konjugátu, je stanovena aktivita enzymu, který je navázán na sendviči, přidáním vhodného substrátu. Množství vzniklého produktu je přímo úměrné množství antigenu ve vzorcích. Změna zabarvení je přímo úměrná množství antigenu ve vzorku. Ukázka pozitivní reakce je vyobrazena na Obrázku 4, kde žlutá barva označuje pozitivní reakci a negativní reakce je bezbarvá.



Obrázek 4: Ukázka pozitivní reakce na mikrotitrační destičce [35]

Vhodným enzymem pro značení bývá alkalická fosfatáza. Nepřímá sendvičová ELISA pracuje na podobném způsobu jako přímá. Jediným rozdílem je přidání detekující látky, která ovšem není enzymově značená. Po inkubaci a promývání se detekující protilátka sama detekuje přidáním anti druhového enzymového konjugátu. Dále metoda pokračuje stejně jako přímá sendvičová ELISA [33]. Limity detekce u některých korýšů nalezneme v Tabulce 11 [35].

Tabulka 11: Detekční limity u korýšů [35]

Druh korýše	Detekční limit stanovení ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Krabi (obecný, královský)	0,001
Krab sněžný	0,001
Krevety	1,500
Humr	0,047

Další metodou na stanovení tropomyosinu v potravinách je PCR neboli polymerázové řetězová reakce. Tato metoda má vysokou citlivost a může se využít pro stanovení velmi malého množství vzorku ve směsi [36]. Základem této reakce je možnost průběžného sledování množství specifických sekvencí nukleových kyselin – především DNA. Během tepelně inhibované reakce dochází k cyklicky se opakující syntéze DNA, kdy se k opačným koncům vybraného úseku řetězců denaturované DNA hybridizují dva krátké oligonukleotidy, které nazýváme primery. Poté do reakce přidáváme enzym DNA-polymerázu a směs deoxynukleotidů. Od primerů se následně tvoří nová vlákna na obou matricových řetězcích [37-38]. Při experimentu se postupuje tak, že jsou zvířata ošetřena dle vyhlášky o péči a použití experimentálních zvířat. Oe a kolektiv zvířata anestetizovali pomocí 15 mg/kg pentobarbitalu.

Svalová vlákna pro analýzu byla vyříznuta z centrální části a ihned byla ponořena do stabilizačního činidla a uchována při teplotě -20°C až do analýzy [39].

2.3. Bílkovinné alergeny ve vejcích

Velmi rozšířenou metodou stanovení vaječných alergenů je použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) [40].

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) řadíme mezi nejčastěji používané separační metody. Separace funguje na principu vnášení vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. První je stacionární fáze (SF), která je nepohyblivá a je zakotvena na nepohyblivém nosiči uvnitř chromatografické kolony. Druhá je mobilní fáze (MF), která je pohyblivá a je vysokým tlakem (který je vyvíjen pomocí vysokotlakých čerpadel, pracovní tlak 30-120 MPa) protlačována okolo a skrz stacionární fázi. Složky, které se ke stacionární fázi poutají silněji, zůstávají v koloně déle a zbytek odchází z kolony ven. Na základě tohoto principu se jednotlivé složky od sebe oddělí [41].

Hmotnostní spektrometrie (MS) je spektrální technika, která využívá separace iontů. Používá se ke zjištění elementárního složení vzorku, kvalitativní a kvantitativní analýze, složení vzorku a ke zjištění struktury a složení povrchů. Princip hmotnostní spektrometrie spočívá v převedení molekul na ionty. Vznikající ionty se následně rozdělují podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Ionty dopadají na detektor, který vysílá signál do počítače, který signály převede do formy hmotnostního spektra [42]. Přístroj, na kterém se hmotností spektrometrie provádí, se jmenuje hmotnostní spektrometr. Jedná se o iontově-optické zařízení, které je složeno ze třech základních částí. První je iontový zdroj, který štěpí molekuly na ionty. Hmotnostní analyzátor je druhou částí, ten zajišťuje separaci iontů právě podle poměru hmotnosti a náboje. Poslední částí je detektor, který poskytuje data pro výpočet každého iontu. Hmotnostní spektrometry pracují za vakua [43].

Ve spojení těchto dvou technik byl v posledních letech zaznamenán velký pokrok. Spojení představuje techniku s vysokou a účinnou schopností separace jednotlivých složek analyzovaného vzorku. Hlavní výhodou této metody je, že dokáže stanovit čtyři hlavní alergeny (sója, mléko, vejce, arašídy) současně s velkou citlivostí a specifitou [40]. Planque a kolektiv extrahovali vaječné proteiny v 200 ml HCl. Poté bylo provedeno štěpení trypsinem a produkty tohoto štěpení byly analyzovány právě pomocí této kombinované metody. Později byla analýza provedena v sušenkách, které se skládaly z vajec, mléka, sóji a arašídů. Směs byla 10 minut

míchána mechanickým mixérem, aby se zajistila homogenita směsi. Sušenky se pekly na 180°C po dobu 18 minut. Poté byly jemně rozemlety a rozpuštěny v 200 ml NH₄HCO₃. Vzorek se poté štěpil trypsinem a byl analyzován pomocí HPLC-MS metody. Limit detekce této metody byl 3,4 mg/kg pro vaječný bílek a 30,8 mg/kg pro vaječný žloutek [40].

Mezi často používané metody stanovení vaječných alergenů můžeme ještě zařadit přímou hmotnostní spektrometrii (MS) a detekci pomocí ELISA kitů. ELISA je v tomto případě sendvičového typu, probíhá ve dvou imunologických krocích, které využívají specifické protilátky, které reagují s proteiny vaječného bílku. Využívá se v potravinářství tam, kde byly potraviny upraveny teplotou maximálně do 70°C. Mez detekce pro tuto metodu byla stanovena na 1 mg/kg. Dalšími, ale méně používanými metodami využívající hmotnostní detektor jsou SELDI (surface enhanced laser desorption ionization), což je laserová desorpce zvýšená povrchem a MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization), což je ionizační metoda pomocí laserové desorpce s přispěním matrice [44].

2.4. Parvalbumin u ryb

Při stanovení parvalbuminu u ryb se opět jako nejvhodnější cesta jeví metoda ELISA. Rozvinutou sendvičovou ELISA metodou je možné stanovit až 0,7 µg parvalbuminu na 1 g vzorku. Sendvičová ELISA metoda je již popsána v kapitole 2.2. [4].

Další možnost stanovení je polymerázová řetězová reakce (PCR), založena na detekci DNA, podobně, jako se využívá u stanovení tropomyosinu u korýšů. Tato metoda je pro stanovení parvalbuminu dostatečně specifická. Při výzkumu, kdy bylo zkoumáno 24 vzorků produktů, vyrobených z mořských ryb, byla stanovena mez detekce na 10 pg/µl [45]. Často používanou metodou je také real-time PCR. Ta pracuje na podobném principu jako klasická PCR. Jediným rozdílem je přítomnost cykleru, který monitoruje fluorescenci emitovanou v průběhu reakce v každém cyklu. Zaznamenává DNA, jejíž detence je možná díky přítomnosti fluorescenčního substrátu, který ji váže. Oproti klasické PCR metodě lze provést lepší kvantifikaci vzorku. Vzorek k analýze se připravuje extrakcí pomocí SPE, což je metoda, založená na distribuci analytu mezi vodnou a tuhou fází. Rovnováha je posunuta ve prospěch tuhé fáze [46].

U tohoto tématu je vhodné zmínit otravy histaminem, což je biogenní amin. Tyto otravy totiž vznikají při konzumování přímo ryb, nebo potravin z nich. Je závislá na množství snědené potraviny, na rozdíl od alergie. V potravinách vzniká působením bakterií z bílkovin [8].

Tepelná úprava nesníží jeho účinky. Právě při nadměrné konzumaci způsobuje symptomy typu alergií. Další potraviny, které mohou obsahovat histamin, jsou sýry, červená vína a kvasné nápoje [9]. Ke stanovení histaminu se používá HPLC, tedy vysokoúčinná kapalinová chromatografie, jejíž princip je popsán v kapitole 2.3. [47]. Příprava vzorku obvykle zahrnuje extrakci kapalinou. Mobilní fází bývá nejčastěji acetonitril nebo methanol v kombinaci s vodou, případně jejich směsí [48]. Separace probíhá při teplotě 30°C a používá kolona s chemicky vázanou oktadecyl stacionární fází (např. Kromasil C18) [49].

2.5. Bílkovinné alergeny u arašídů

U skupiny alergenů obsažených v arašídech můžeme použít stejnou kombinaci metod jako u stanovení vaječných alergenů, čili vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS) [38]. Novější studie ukázaly, že ještě lepších výsledků se dosáhne při použití hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) [50]. I při tomto typu hmotnostní spektrometrie se lepších výsledků dosahuje při použití kombinace metody s kapalinovou chromatografií. Při přípravě vzorku k analýze byly arašídy rozemlety a dále byly extrahovány po dobu 2 hodiny pomocí pufru (HCl, NaCl) za neustálého třepání. Proteiny v extraktu byly následně rozštěpeny a vzorek poté analyzován. Mez detekce bílkovinných alergenů byla pod 10 µg/g [51].

Další, velmi často používanou metodou, je real-time PCR (RT-PCR), jejíž princip byl popsán v kapitole 2.4. Tato metoda je u stanovení arašídových alergenů dostatečně specifická a citlivá. Používá se také pro stanovení vlašských ořechů, kde dosahuje ještě lepších výsledků. Detekční limit u této metody je až 2,5 pg/kg. Metoda RT-PCR dosahuje větší citlivosti a spolehlivosti, než dostupné ELISA kity. ELISA má také dobré detekční limity, ale ne tak dobré, jako u metody RT-PCR. Je možné detekovat alergeny o koncentraci cca 10 mg/kg, ovšem problémem jsou zkřížené reakce arašídů, které vedou k falešným pozitivním výsledkům [50]. Pomocí ELISA metody lze stanovovat i stěry z talíře, na kterém ležely arašídy. Výsledek těchto stěrů byl pozitivní. Bylo zjištěno, že stopy po arašídech zůstávají na povrchu předmětů až 24 měsíců [51]. Klasická PCR metoda je méně používána, protože je zaměřena na specifické úseky DNA. Alergenní složky jsou ale bílkovinné povahy, takže metoda neumožňuje přímou detekci [52].

Méně využívanou možností stanovení alergenů arašídů je metoda radioalergen sorbentové inhibice (RAST). Poprvé byla použita u stanovení arašídového másla

ve slunečnici máselné. Obsah arašídového másla byl detekován v rozsahu 3000-33000 ppm. Ara h1 protein byl extrahován přímo z arašídů, kde se jeho obsah pohyboval od 31 do 94 %. Detekční limit byl stanoven na 10 ppm [53].

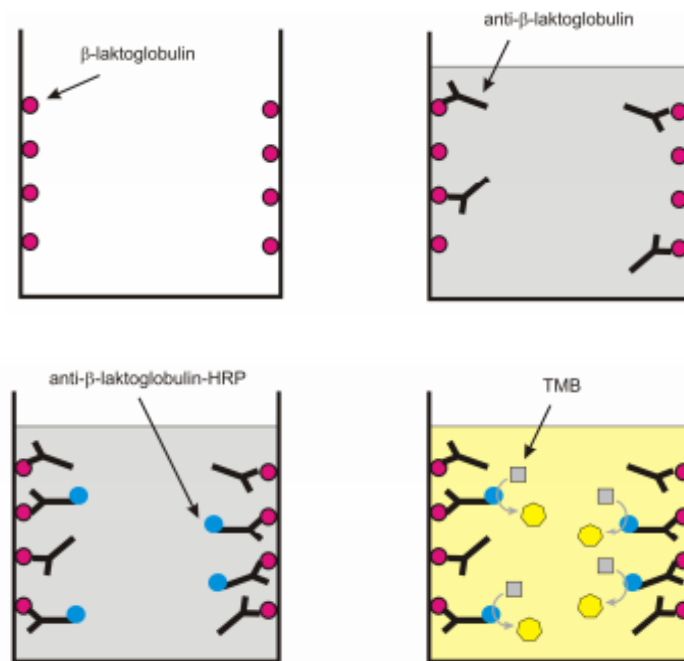
2.6. Alergeny sóji

Ke stanovení sóji se používá RT-PCR, čili polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Metoda je tak citlivá, že dokáže odhalit i jedinou molekulu DNA ve vzorku a to tak, že ji namnoží řádově milionkrát. Dříve se k detekci sóji využívala analýza proteinů. Vzhledem k rozdílným technologickým postupům výroby potravin se ale měnila jejich rozpustnost a jejich detekce se tak stává složitou. DNA je vzhledem ke svojí stabilitě mnohem vhodnější. Nedetekují se tedy přímo alergii způsobující proteiny, ale molekuly DNA, které se ve většině případů vyskytují společně s proteiny. Detekční limit u této metody je 50 mg/kg [54].

Druhou používanou metodou je ELISA. Ta v potravinářství mimo jiné zkoumá také kvalitu a pravost produktů ze sóje. Limity detekce se pohybují kolem 1 mg/kg [55].

2.7. Alergeny v mléce

Rozšířenou metodou pro stanovení alergenů v mléce je opět sendvičová ELISA. Stanovení je založeno na imunochemické reakci β -laktoglobulinu se specifickou protilátkou, která je ukotvena na stěnách jamek v mikrotitračních destičkách. Po odmytí nenavázaných bílkovin dochází k inkubaci, při které reaguje specifická protilátka konjugovaná s enzymem – křenovou peroxidázou. Po tomto kroku dochází k promytí jamek a β -laktoglobulin se detekuje pomocí přídavku chromogenního substrátu. Podle intenzity zabarvení stanovíme koncentraci β -laktoglobulinu ve vzorcích potravin. Stejný způsob stanovení použijeme také u detence kaseinu, jako dalšího důležitého alergenu v mléce. Princip je velmi podobný, nýbrž vstupující kasein se označí biotinem. Dále se kromě křenové peroxidázy přidá také streptavidin. Poté je postup stejný. Detekční limit byl stanoven přibližně na 1,96 ng/ml. Schéma této metody nalezneme na obrázku číslo 5 [56].



Obrázek 5: Schéma metody ELISA u stanovení alergenů mléka [56]

U mléka často používáme ke stanovení přímo mléko jako takové, bez dalších úprav vzorku. Pouze vzorek vhodně naředíme, aby se koncentrace tukových složek snížila na takové množství, které neovlivní výsledky analýzy. Jedná se o přímou analýzu. Dále se používá tzv. sonikace. Jedná se o proces destrukce buněčných stěn pomocí ultrazvukových vln. Po tomto procesu vzniká čirý vzorek vhodný k analýze [57-59].

Pokročilou metodou, která se používá ke stanovení mléčných alergenů je kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS). V nedávné studii byl sledován rozdíl množství alergenu před tepelnou úpravou a po tepelné úpravě. Tento experiment byl proveden u pečených sušenek. Sušenkové těsto bylo obohaceno o alergenní složky a upečeno při 180°C. Po upečení byly sušenky rozemlety, homogenizovány a použity k experimentu. Výsledkem byl závěr, že se alergenita mléka mírně sníží. Společně s mlékem byly zkoumány také arašídý, sója a vejce [60].

Ojediněle používanou metodou jsou biosenzory, které jsou založeny na rezonanci povrchových plazmonů (SPR-surface plasmon resonance). Tyto senzory se skládají z tenké kovové vrstvy, která je připevněna na skleněném povrchu. Do tohoto povrchu zavádíme světlo, které se po dopadu generuje zvláštní druhy vln, tzv. povrchový plazmon. Tato metoda má vynikající citlivost ve srovnání s metodami ELISA. Detekční limit biosenzorů byl stanoven na 58 ng/ml a dá se dokonce zlepšit použitím sendvičového formátu. Provoz současných SPR

senzorů je ovšem velmi nákladný a přístroje jsou velké, proto se na tuto metodu zaměřují pouze některé laboratoře [60].

Další metodou je RT-PCR, čili polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Metoda dosáhla vysoké citlivosti u stanovení alergenů kravského mléka. Detekční limit byl stanoven na 0,05 ng/g [61].

Alergeny v mléce je možné také stanovit pomocí kapilární elektroforézy [63]. Jedná se o elektromigrační separační metodu, která využívá pohybu nabitých částic ve volném roztoku elektrolytu nebo v nějakém nosném mediu. Pohyb závisí na povrchovém náboji a velikosti molekuly. Pokud je elektrolyt nebo médium naplněno v kapiláře, nazývá se metoda právě kapilární elektroforézou [62]. Zařízení pro kapilární elektroforézu obsahuje separační jednotku neboli kapiláru. Kapiláry se vyrábí z taveného křemene nebo teflonu, s vnitřními průměry od 50 do 75 μm . Délky se pak pohybují mezi 10 až 100 cm. Další částí je zdroj napětí, které vytváří elektrické pole. To je vytvořeno vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Poslední částí je detektor, který získává signál přes detekční celu přímo z kapiláry. Detekce může být spektrofotometrická, konduktometrická, refraktometrická, vodivostní nebo amperometrická [42, 62-64]. Pro ještě lepší výsledky stanovení se používá kapilární elektroforézu kombinovat s laserovou desopřční/ionizační hmotnostní spektrometrií s matricovou podporou (MALDI MS) [61].

3 Závěr

Alergie na potraviny je čím dál tím více rozšířenou nemocí mezi populací a proto by se mělo co nejvíce informací dostat mezi širokou veřejnost. Alergie na potraviny postihuje jedince napříč generacemi a v mladším věku dítěte může ještě postupně vymizet. Práce se věnuje 14 skupinám alergenů, které upravuje legislativa. Tyto alergeny se musí označovat na všech obalech výrobků, ale také ve všem stravovacích zařízení a to v písemné formě. Stupně nemoci jsou různé. Začínají již při kontaktu osoby s alergenem při přípravě, dále požití stopového množství anebo potraviny, která je tvořena především alergenem. Pro postižené jedince to znamená, že musí hlídat veškeré složení potravin, které chtějí jíst a vyhybat se těm potravinám, které obsahují dané alergeny. Výsledkem tohoto počínání může být nedostatek důležitých živin, a proto musí jedinec vždy najít adekvátní náhradu suroviny. Následky začínají na kožních problémech a otocích rtů, jazyka. Výjimkou však není ani život ohrožující anafylaktická reakce. Potravinová alergie je v současné době nevléčitelnou nemocí.

Metod, které se používají na stanovení alergenů v potravinách, je celá řada. Nejvíce používaná je kombinace metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Výhodou je vysoká citlivost a univerzálnost metody, lze ji použít na stanovení většího počtu alergenů v jedné analýze. Spojení nám také umožňuje v jedné analýze separovat i identifikovat složitou směs látek. Další metodou, která se dá také použít prakticky u všech alergenů je ELISA. ELISA je imunologická metoda, která není nijak instrumentálně ani finančně náročná, protože probíhá na např. polystyrénových destičkách s jamkami a stanovení alergenu se sleduje na intenzitě zbarvení jednotlivých jamek. Jejimi výhodami jsou rychlost a spolehlivost analýzy. Metoda je také dostatečně specifická a to díky používaným protilátkám, které mají vysokou afinitu k cílovým antigenům. Mezi nevýhody řadíme nižší citlivost na přítomné alergeny. Další používanou metodou je hmotnostní spektrometrie. Mezi její výhody patří vysoká citlivost a minimální spotřeba analyzovaného vzorku. Nevýhoda je vysoká pořizovací cena a vysoké provozní náklady. Mezi další používané metody patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza nebo polymerázová řetězová reakce.

Seznam zdrojů

1. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: TRITON, 2009. 320 s. ISBN 978-80-7387-280-9.
2. STÁTNÍ ZEMĚDELSKÁ A POTRAVINÁŘSKÁ INSPEKCE. *Potraviny na pranýři* [online]. Ing. Kateřina Pavelková, 27. 07. 2015. [cit. 11. 4. 2016]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/ochrana-spotrebitelu-pred-alergennimi-potravinami-oznacovani-alergennich-slozek.aspx>.
3. DOHNAL, Karel. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena*. 3. vydání. Praha: Triton, 2002, 148 s. ISBN 80-7254223-0.
4. LITZMAN, Jiří, RYBNÍČEK, Ondřej, KUKLÍNEK, Pavel. *Alergologie a klinická imunologie*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2011, 144s. ISBN 80-7013-345-7.
5. SUCHÁNKOVÁ, Martina. *Učitelé a alergie*. Diplomová práce, MU PdF Katedra biologie, 2003.
6. MAČÁK, Jiří, MAČÁKOVÁ, Jana. *Patologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing a.s., 2004, 348s. ISBN 80-247-0785-3.
7. FUCHS, Martin. *Potravinové alergie*. 1. vydání. Praha: Maxdorf, 2013. 44 s. ISBN 978-80-7345-335-0.
8. NEVORAL, Jiří. *Výživa v dětském věku*. 1. vydání. Jinočany: Nakladatelství H&H Vyšehradská, s. r. o., 2003, 434 s. ISBN 80-86-022-93-5.
9. KVASNIČKOVÁ, Alexandra. *Alergie z potravin*. 1. vydání. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998, 60s. ISBN 80-85-120-93-3.

10. LITZMAN, Jiří, RYBNÍČEK, Ondřej, KUKLÍNEK, Pavel. *Alergologie a klinická imunologie*. 1 vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2001, 144s. ISBN 80-7013-345-7.
11. FERENČÍK, Miroslav, ROVENSKÝ, Jozef, SHOENFELD, Yehuda, MAŤHA, Vladimír. *Imunitní systém: Informace pro každého*. 1. vydání. Praha: Grada, 2005, 236s. ISBN 80-247-1196-6.
12. STRNADELOVÁ, Vladimíra, ZERZÁN, Jan. *Radost ze zdravých dětí*. 3. vydání. Olomouc: Anag, 2007, 456s. ISBN 978-80-726-383-52.
13. HAVLÍK, Jaroslav, MAROUNEK, Milan. *Živiny a živinové potřeby člověka*. 2. vydání. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2013, 134s. ISBN 978-80-213-2374-2.
14. FUCHS, Martin. *Alergie číhá v jídle a pití*. 2. vydání. Praha: ADELA, 2005. 187 s. ISBN 80-902532-5-3.
15. VETERINÁŘSTVÍ. *Koryši a alergie* [online]. Ing. Martin Sedláček, 8. 7. 2008. [cit. 18. 4. 2016]. Dostupné z: <http://vetweb.cz/korysi-a-alergie/>
16. ŠPIČÁK, Václav, PANZNER, Petr. *Alergologie*. 1. vydání. Praha: Galén, 2004, 348s. ISBN 978-80-7262-265-8.
17. DRÁPAL, ETTLEROVÁ, HAJŠLOVÁ, HLÚBIK, JECHOVÁ, KOZÁKOVÁ, MALÍŘ, OSTRÝ, RUPRICH, SOSNOVCOVÁ, ŠPELINA, WINKLEROVÁ. *Potravinová přecitlivělost: alergie a intolerance*. Vědecký výbor pro potraviny: ALERG/2003/3/deklas, Státní zdravotní ústav, Brno, 2003, 38s.
18. JIMRAMOVSKÝ, František, FUCHS, Martin. *Kojení a začátky s výživou: Průvodce s výživou v prvním roce života*. 1. vydání. Praha: Nutricia, 2011. 39 s.

19. NOVÁK, Jan, NOVÁKOVÁ, Helena. *Alergenní rostliny*. Praha: Knižní klub, 2010, 264s. ISBN 978-80-242-2591-3.
20. GABROVSKÁ, Dana. *Potravinářská revue: Potravinová přecitlivělost-alergie a intolerance*. Praha: Agral s. r. o., 2010, č. 6, ISSN 106094.
21. SLAVÍK, Bohumil. *Květena České republiky 4*. 1. vydání. Praha: Academia, 2000, 529 s. ISBN 80-200-0384-3.
22. MYLOVÁ, Natalia. Copyright Cyril & Metoděj s. r. o. Největší portál pro alergiky v ČR. *Alergie na lupinu neboli vlčí bob* [online]. [cit. 2. 1. 2017] Dostupné z: <https://www.proalergiky.cz/alergie/clanek/lupina-lustenina-podobna-soji>
23. STÁTNÍ ZEMĚDELSKÁ A POTRAVINÁŘSKÁ INSPEKCE. *Potravinový pranýř* [online]. Ing. Kateřina Pavelková, 27. 07. 2015. [cit. 26. 4. 2017]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/oznacovani-potravin-z-hlediska-obsahu-lepku.aspx>
24. AHMAD, Haseeb, NACHE, Marius, HITZMANN, Bernd. Potential of fluorescence spectroscopy in detection of low-levels of gluten in flour: A preliminary study. *Food control*. Oxford: Elsevier sci ldt, 2017, 73, 401-405, ISSN 0956-7135.
25. VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence*. 1st edition. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 256 p. ISBN 35-276-0024-8.
26. LAKOWICZ, Joseph. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd edition. New York: Springer, 2006, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.
27. GUERRIERI, Nicoletta, ALBERTI, Enrica, LAVELLI, Vera, CERLETTI, Paolo. Use of spectroscopic and fluorescence techniques to assess heat-induced molecular modification of gluten. *Cereal chemistry journal*. Oxford: Elsevier sci ldt, 1996, 73.3, 368-374. ISSN 0009-0352.

28. AHMAD, Haseeb, NACHE, Marius, WAFFENSCHMIDT, Stephanie, HITZMANN, Bernd. A fluorescence spectroscopic approach to predict analytical, rheological and baking parameters of wheat flours using chemometrics. *Journal of food engineering*. Oxford: Elsevier sci ldt, 2016, 182, 65-71. ISSN 0260-8774.
29. EKSIN, Ece, CONGUR, Gulsah, ERDEM, Arzum. Electrochemical assay for determination of gluten in flour samples. *Food chemistry*. Oxford: Elsevier sci ldt, 2015, 184, 183-187. ISSN 0308-8146.
30. SEDIUM RD, RESEACH AND DEVELOPMENT. *Portfolio produktů* [online]. Štěpán Šturm, 2014. [cit. 27. 6. 2017]. Dostupné z: <http://www.sedium-rd.cz/produkty.php?page=enzym>
31. HELÁN, Václav. *Elektroanalytické metody: Sborník přednášek z kurzu*. 1. vydání. Český Těšín: 2 THETA, 2001, 316s. ISBN 80-86380-07-6.
32. MAŠKOVÁ, Eva, PAULÍČKOVÁ, Ivana, RYSOVÁ, Jana, GABROVSKÁ, Dana. Evidence for wheat, rye, and barley presence in gluten free food by PCR method-comparison with ELISA method. *Czech journal of food science*. 2011, 29, 45-50. ISSN 1212-1800.
33. CUSABIO. *Cubasio ELISA kit by target species* [online]. Sabrina Selway. 2014. [cit. 19. 6. 2017]. Dostupné z http://www.cosmobiousa.com/csb_kits_mouse.html.
34. CROWTHER, John. *The ELISA guidebook*. 2st edition. Totawa: Humana Press Inc, 2009, 71p. ISBN 978-89603-950-6.
35. RAHMAN, Anas, HELLEUR, Robert, JEEBHAY, Mohamed, LOPATA, Andreas. *Allergic diseases-Highlights in the clinic*. 1st edition. Rijeka: Intech, 2012, 566p. ISBN 978-953-51-0227-4.

36. ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE. *Využití metody ELISA pro vyhodnocování efektivity vakcinace u vybraných druhů onemocnění* [online]. Petra Straková, 2011. [cit. 19. 6. 2017] Dostupné z: <http://textarchive.ru/c-1947058-pall.html>.
37. KRÁLOVÁ, Blanka. *Bioanalytické metody*. 3. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2008, 254s. ISBN 978-80-7080-449-0.
38. BUSTIN, Stephen. *A-Z of quantitative PCR*. 1st edition. San Diego: International University Line, 2004, 910p. ISBN 096-3681-788.
39. OE, M., OJIMA, K., NAKAJIMA, I., CHIKUNI, K., SHIBATA, M., MUROYA, S. Distribution of tropomyosin isoforms in different types of single fibers isolated from bovine skeletal muscles. *Meat science*. Oxford: Elsevier sci ldt, 2016, 118, 129-132. ISSN 0309-1740.
40. PLANQUE, M., ARNOULD, T., DIEU, M., DELAHAUT, P., RENARD, P., GILLARD, N. Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuffs. *Journal of chromatography A*. Amsterdam: Elsevier science BV, 2016, 1464, 115-123. ISSN 0021-9673.
41. CHURÁČEK, Jaroslav, JANDERA, Pavel. *Separace látek*. 2. vydání. Praha: SNLT, 1986, 140s. ISBN 05-033-86.
42. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. vydání. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003, 132s. ISBN 80-86369-07-2.
43. GROSS, Jürgen. *Mass spektrometry*. 1st edition. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004, 517p. ISBN 3-540-40739-1.

44. PILOLLI, Rosa, CHAUDHARI, Ravindra, PALMISANO, Francesco, MONACI, Linda. Development of a mass spectrometry immunoassay for unambiguous detection of egg allergen traces in wines. *Analytical and bioanalytical chemistry*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2017, 409, 1581-1589. ISSN 1618-2642.
45. SHIBAHARA, Yusuke, UESAKA, Yoshihiko, WANG, Jun, YAMADA, Shoichi, SHIOMI, Kazuo. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fish protein in processed foods. *Food chemistry*. Oxford: Elsevier sci ltd, 2013, 136, 675-681. ISSN 0308-8146.
46. RENCOVA, E., KOSTELNIKOVA, D., TREMLOVA, B. Detection of allergenic parvalbumin of Atlantic and Pacific herrings in fish products by PCR. *Food additive and contaminant part a-chemistry analysis controle exposure & risk assessment*. Abingdon: Taylor & Francis ltd, 2013, 30, 1679-1683. ISSN 1944-0049.
47. TANG, T., QIAN, Q., Shi, T., WANG, F., LI, J., CAO, Y., HU, Q. Monitoring the contents of biogenic amines in sufu by HPLC with SPE and pre-column derivatization. *Food control*. 2011, 22, 1203-1208. ISSN 0956-7135.
48. PRADO, Marta, BOIX, Ana, VON HOLST, Christoph. Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of mackerel and horse mackerel. *Food control*. Oxford: Elsevier sci ltd, 2013, 34, 19-23. ISSN 0956-7135.
49. INNOCENTE, N., BIASUTTI, M., PADOVESE, M., MORET, S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food chemistry*. 2007, 101, 1285-1289. ISSN 0308-8146.
50. KORTE, Robin, LEPSKI, Silke, BROCKMEYER, Jens. Comprehensive peptide marker identification for the detection of multiple nut allergens using non-targeted LC-HRMS multi-method. *Analytical and bioanalytical chemistry*. Heidelberg: Springer Heidelberg, 2016, 408, 3059-3069. ISSN 1618-2642.

51. KOPPELMANN, S. J., HEFLE, S. L. *Detection allergen in food*. 1st edition. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006, 428 s. ISBN 978-1855-7372-80.
52. KORTE, Robin, LEPSKI, Silke, BROCKMEYER, Jens. Comprehensive peptide marker identification for the detection of multiple nut allergens using a non-targeted LC-HRMS multi-method. *Analytical and bioanalytical chemistry*. Heidelberg: Springer Heidelberg, 2016, 408, 3059-3069. ISSN 1618-2642.
53. LINACERO, Rosario, BELLESTEROS, Isabel, SANCHIZ, Africa, PRIETO, Nuria, INIESTO, Elisa, MARTINEZ, Yolanda, PEDROSA, Mercedes, MUZQUIZ, Mercedes, CABANILLAS, Beatriz, ROVIRA, Merce, BURBANO, Carmen, CUADRADO, Carmen. Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods. *Food chemistry*. Oxford: Elsevier csi ltd, 2016, 202, 334-340. ISSN 0308-8146.
54. MARTIN-FERNANDEZ, Begona, COSTA, Joana, OLIVEIRA, Maria, LOPEZ-RUIZ, Beatriz, MAFRA, Isabel. Combined effects of matrix and gene marker on the real-time PCR detection of wheat. *International journal of food science and technology*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2016, 51, 1680-1688. ISSN 0950-5423.
55. JANKOVIC, Vesna, LAKICEVIC, Brankica, PETRONJEVIC, Radivoj, SPIRIC, Danka, DORDEVIC, Vesna, POPOV-RALJIC, Jovanka. Soybean and gluten in meat products consumer protection strategy. *Agro food industry HI-TECH*. Milano: Teknoscienze publishing, 2016, 27, 30-32. ISSN 1722-6996.
56. HE, Shengfa, LI, Xin, GAO, Jinyan, TONG, Ping, CHEN Hongbing. Development of sandwich ELISA for testing bovine beta-lactoglobulin allergenic residues by specific polyclonal antibody against human IgE binding epitopes. *Food chemistry*. Oxford: Elsevier csi ltd, 2017, 227, 33-40. ISSN 0308-8146.

57. MURCIA, M., Antonia, VERA, Ana, MARTINEZ-TOME, Magdalena, MUNOZ, Antonio, HERNANDEZ-CORDOBA, Manuel, ORTIZ-GONZALES Roque. Fast determination of the Ca, Mg, K, Na and Zn contents in milk and nondairy imitation milk using ICP-AES without mineralization stage. *LWT-Food science and technology*. Oxford: Elsevier sci ltd, 1999, 32, 175-179. ISSN 0023-6438.
58. CAVA-MONTESINOS, Patricia, CERVERA, Luisa, PASTOR, Agustin, DE LA GUARDIA, Miguel. Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk. *Analytica chimica acta*. Oxford: Elsevier sci ltd, 2005, 531, 111-123. ISSN 0003-2670.
59. PILOLLI, Rosa, DE ANGELIS, Elisabetta, MONACI, Linda. Streamlining the analytical workflow for multiplex MS/MS allergen detection in processed foods. *Food chemistry*. Oxford: Elsevier sci, ltd, 2017, 221, 1747-1753. ISSN 0308-8146.
60. ASHLEY, J., PIEKARSKA, M., SEGERS, C., TRINH, L., RODGERS, T., WILLEY, R., TOTHILL, E. An SPR based sensor for allergens detection. *Biosensors & bioelectronics*. Oxford: Elsevier advanced technology, 2017, 88, 109-113. ISSN 0956-5663.
61. GUAN, Xiao, CAI, Qin, ZHANG, Wenju, CHEN, Qin. Development of real-time quantitative PCR assay using a TaqMan minor groove binder probe for the detection of alpha-lactalbumin in food. *Journal of dairy science*. New York: Elsevier science inc, 2016, 99, 1716-1724. ISSN 0022-0302.
62. GASILOVA, Natalia, GIRAULT, Hubert. Component-resolved diagnostic of cow's milk allergy by immunoaffinity capillary electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*. Washington: American chemical soc, 2014, 86, 6337-6345. ISSN 0003-2700.
63. GAŠ, Bohuslav. Kapilární elektroforéza. *Vesmír*. Praha: 2001, 80, 370-373. ISSN 1214-4029.

64. PRIMER, A. *High performance capillary electrophoresis*. 2. vydání. Berlin: Agilent technologis, 2009, 174s. ISBN 5990-3777.