

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

**POTENCIALNA NEVARNOST ALERGIJ NA
ŽUŽELKE KOT NOVEGA VIRA PREHRANSKIH
BELJAKOVIN PRI PSIH**

**POTENTIAL RISK OF ALLERGY TO INSECTS AS A
NEW SOURCE OF DIETARY PROTEIN FOR DOGS**

Ana Škorjanc, Ana - Lucija Škrajnar

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 604.4:636.7.085:595.7:57.083.32(043.2)

**POTENCIALNA NEVARNOST ALERGIJ NA ŽUŽELKE KOT
NOVEGA VIRA PREHRANSKIH BELJAKOVIN PRI PSIH**

**POTENTIAL RISK OF ALLERGY TO INSECTS AS A NEW
SOURCE OF DIETARY PROTEIN FOR DOGS**

Ana Škorjanc, Ana - Lucija Škrajnar

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom (Verzija 3, 28.4.2014) pod mentorstvom izr. prof. dr. Brede Jakovac Strajn, dr. vet. med. in somentorstvom prof. dr. Petre Zrimšek, univ. dipl. kem., prof. kem. na Inštitutu za varno hrano, krmo in okolje ter na Inštitutu za predklinične vede Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2019

IZVLEČEK

Ključne besede: Prehrana živali; proteini žuželk – imunologija; preobčutljivost na hrano; mokaerji – imunologija; imunoglobulini E; navzkrižne reakcije; psi

V zadnjem času se pojavljajo v prehrani psov tudi beljakovine žuželk, ki predstavljajo nov, alternativni vir beljakovin za pse, ki so pogosto preobčutljivi na beljakovine mesa v svoji prehrani (piščanec in govedina). Preobčutljivost na hrano je namreč tretja najpogostejša alergijska bolezen pri psih in pomeni 5 % vseh dermatoz. Namen našega dela je bil prispevati k področju raziskav ugotavljanja potencialne alergenosti beljakovin mokaerjev. V raziskavo smo vključili 31 psov, pri katerih smo opravili klinični pregled in v serumu določali prisotnost protiteles razreda E (IgE) proti prehranskim pršicam *Tyrophagus putrescentiae* in *Acarus siro*. V testno skupino (21 psov) smo vključili pse z znaki alergijske bolezni, v kontrolo skupino (10 psov) pa klinično zdrave pse. S kemijskimi analizami smo določili hranilno vrednost ličink mokaerjev (*Tenebrio molitor*). Beljakovine ličink smo ekstrahirali v kislem in bazičnem mediju, določili njihovo koncentracijo (spektrofotometrično) in elektroforezni profil, jih razgradili s prebavnimi encimi in analizirali elektroforezni profil razgradnih produktov. Po 60 minutah razgradnje s pepsinom so se molekule večje od 43 kDa razgradile, nadaljnja razgradnja s tripsinom in α -kimotripsinom pa ni pokazala sprememb v razgrajenosti beljakovin. V vzorcih krvnih serumov psov smo z imunoblotom ugotavljali specifične vezave IgE na beljakovine mokaerjev. Pri imunoblotih vseh vzorcev so se IgE vezala z beljakovinami v območju velikosti med 20 in 30 kDa. Razlike med serumi psov pa so se pojavljale v vezavi IgE z beljakovinami v območju med 34 in 55 kDa ter z beljakovino z molsko maso 14 kDa, dobljeno po razgradnji s prebavnimi encimi. Razlike med kontrolno in testno skupino pa niso potrdile statistično značilne povezave med prisotnostjo imunogenih lis, kliničnimi znaki alergij in prisotnostjo IgE proti prehranskim pršicam ($P > 0,05$).

ABSTRACT

Key words: Animal nutrition; insect proteins – immunology; food hypersensitivity; tenebrio – immunology; immunoglobulin E; cross reactions; dogs

A new, alternative protein source is starting to appear in dog feed. It is insect protein and it could be used for dogs that are hypersensitive to other proteins such as chicken or beef. Food hypersensitivity is the third most common allergic disease in dogs and represents 5 % of all dermatoses. The aim of our study was to contribute to the field trying to establish the allergenicity potential of mealworm. A clinical examination and serum IgE concentration against *Tyrophagus putrescentiae* and *Acarus siro* was determined on 31 dogs. The test group comprised of 21 dogs with clinical signs of allergic disease and the control group 10 clinically healthy dogs. The nutritional value of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) was determined with chemical analysis. The larvae proteins were extracted in acidic and alkaline medium and the protein concentration and its electrophoretic profile were determined. Proteins were digested with digestion enzymes and the electrophoretic profile of the decomposition products was analysed. After 60 minutes of pepsin decomposition, the molecules bigger than 43 kDa decomposed and the further decomposition with trypsin and α -chymotrypsin did not show changes in protein decomposition. Immunoblots were used to determine specific binding of dog blood serum IgE to mealworm protein. All samples showed binding to proteins between 20 and 30 kDa. Differences appeared in binding IgE to proteins between 34 and 55 kDa and to a protein with 14 kDa. The differences between test groups did not confirm statistically significant link between the presence of immunogenic stains, clinical signs of allergy and the presence of IgE against mites ($P > 0.05$).

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2	CILJ RAZISKOVANJA	2
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	3
2	PREGLED LITERATURE	4
2.1	ŽUŽELKE KOT VIR BELJAKOVIN V PREHRANI LJUDI IN ŽIVALI.....	4
2.2	PREDNOSTI REJE ŽUŽELK	5
2.3	VELIKI MOKAR (<i>Tenebrio molitor</i>).....	7
2.4	HRANILNA VREDNOST ŽUŽELK.....	9
2.5	TVEGANJA PRI UPORABI ŽUŽELK V PREHRANI LJUDI IN ŽIVALI.....	11
2.5.1	Mikrobiološka tveganja.....	12
2.5.2	Parazitarna tveganja	14
2.5.3	Tveganje za prionske bolezni	14
2.5.4	Kemijska tveganja	15
2.5.5	Tveganja za alergije	16
2.6	ALERGENI V ŽUŽELKAH.....	17
2.7	NETOLERANCA IN PREOBČUTLJIVOST ZA HRANO PRI PSIH	18
2.8	METODE UGOTAVLJANJA ALERGENOSTI BELJAKOVIN V HRANI.....	20
2.9	METODE UGOTAVLJANJA ALERGENOSTI HRANE PRI PSIH.....	21
2.10	PREOBČUTLJIVOST NA PRŠICE.....	22
3	MATERIALI IN METODE	24
3.1	MATERIALI.....	24
3.1.1	Zbiranje in priprava serumov psov.....	24
3.1.2	Priprava moke iz ličink mokaarjev	25

3.2 METODE.....	25
3.2.1 Vprašalnik za lastnike	25
3.2.2 Klinični pregled psov	25
3.2.3 Ekstrakcija beljakovin iz ličink mokařev	26
3.2.3.1 Kisla ekstrakcija s HCl	26
3.2.3.2 Bazična ekstrakcija z NaOH.....	27
3.2.4 Določanje koncentracije beljakovin iz mokařev z Bio-Rad-ovim reagentom	27
3.2.4.1 Uporabljene raztopine.....	28
3.2.4.2 Priprava vzorcev in reagenta	28
3.2.4.3 Postopek določanja koncentracije beljakovin.....	28
3.2.5 Razgradnja beljakovin s prebavnimi encimi	29
3.2.5.1 Uporabljene raztopine.....	29
3.2.5.2 Postopek razgradnje beljakovin s prebavnimi encimi	30
3.2.6 Diskontinuirana poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (NaDS-PAGE).....	30
3.2.6.1 Uporabljene raztopine.....	30
3.2.6.2 Izbira beljakovinskega standarda.....	32
3.2.6.3 Priprava vzorcev beljakovinskih ekstraktov za nanos na gel	32
3.2.6.4 Priprava separacijskega poliakrilamidnega gela.....	33
3.2.6.5 Priprava koncentracijskega poliakrilamidnega gela	33
3.2.6.6 Postopek elektroforeze	34
3.2.6.7 Barvanje beljakovin na elektroforeznem gelu	34
3.2.7 Imunoblot	34
3.2.7.1 Prenos beljakovin iz gela na membrano	35
3.2.7.2 Uporabljene raztopine.....	35
3.2.7.3 Postopek imunoblota	36

3.2.8 Določanje hranilnih snovi v ličinkah mokařjev	37
3.2.9 Statistično vrednotenje rezultatov	37
4 REZULTATI.....	38
4.1 REZULTATI EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN MOKARJEV	38
4.2 ELEKTROFORETSKI PROFIL BELJAKOVIN MOKARJEV	38
4.2.1 Elektroforetski profil beljakovin mokařjev po razgradnji s pepsinom, tripsinom in α -kimotripsinom.....	39
4.3 IMUNOBLOTI.....	41
4.3.1 Prisotnost imunogenih lis glede na klinični status psov in prisotnost protiteles razreda E (IgE) proti prehranskim pršicam	42
4.3.1.1 Prisotnost protiteles razreda E (IgE) proti prehranskim pršicam glede na klinični status živali	42
4.3.1.2 Prisotnost imunogenih lis glede na klinični status živali.....	42
4.3.1.3 Prisotnost imunogenih lis glede na prisotnost protiteles razreda E (IgE) proti prehranskim pršicam.....	43
4.4 HRANILNA VREDNOST LIČINK MOKARJEV	44
5 RAZPRAVA.....	45
6 SKLEPI	53
7 POVZETEK	54
8 ZAHVALA	56
9 LITERATURA	57
10 PRILOGE.....	67

KAZALO SLIK

Slika 1: Izkoristljivost žuželk (črčkov) v primerjavi z rejnimi živalmi.....	6
Slika 2: Primerjava proizvodnje toplogrednih plinov, porabe energije in porabe prostora med mocarji in ostalimi pogostimi viri beljakovin	7
Slika 3: Veliki moka (<i>Tenebrio molitor</i>).....	8
Slika 4: NaDS-PAGE beljakovin mokaarjev	38
Slika 5: NaDS-PAGE beljakovin mokaarjev, izoliranih s kislo ekstrakcijo, po encimski razgradnji s prebavnimi encimi	39
Slika 6: NaDS-PAGE beljakovin mokaarjev, izoliranih z bazično ekstrakcijo, po encimski razgradnji s prebavnimi encimi	40
Slika 7: Reprezentativen imunoblot	41

KAZALO TABEL

Tabela 1: Primerjava hranilne vrednosti ličink velikega mokařja (<i>Tenebrio molitor</i>) in govejega mesa.....	9
Tabela 2: Vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah mokařjev	10
Tabela 3: Vsebnost mineralov v ličinkah mokařjev	10
Tabela 4: Aminokislinska sestava ličink mokařjev	11
Tabela 5: Protitelesa razreda E (IgE) v serumu psov glede na klinični status živali.....	42
Tabela 6: Deleži imunoblotov s prisotnimi imunogenimi lisami glede na klinični status živali	43
Tabela 7: Deleži imunoblotov s prisotnimi imunogenimi lisami glede na protitelesa razreda E (IgE) proti prehranskim pršicam	44
Tabela 8: Vsebnost hranilnih snovi v vzorcih ličink mokařjev	44

SEZNAM PRILOG

Priloga 1: Vprašalnik za lastnike

Priloga 2: Dermatološki protokol za klinični pregled psov

SEZNAM OKRAJŠAV

EFSA	Evropska agencija za varno hrano
FAO	Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
IgA	imunoglobulini razreda A
IgE	imunoglobulini razreda E
IgG	imunoglobulini razreda G
IgM	imunoglobulini razreda M
kDa	kilodalton (enota za molekulsko maso)
<i>T. putrescentiae</i>	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>
<i>A. siro</i>	<i>Acarus siro</i>

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Na svetu trenutno živi 7,2 milijard prebivalcev, po napovedih strokovnjakov pa je 80 % možnost bo število do leta 2100 naraslo na med 9,6 in 12,3 milijard (Gerland in sod., 2014). S povečevanjem svetovnega prebivalstva se povečuje tudi potreba po hrani, zato v prihodnosti potrebujemo nove vire in nove načine pridelave hrane. Pridelava hrane zelo obremenjuje okolje, zato moramo iskati tudi okolju bolj prijazne načine, ki pa bodo hkrati omogočali dovolj veliko proizvodnjo. V ta namen že preiskujejo nove ali izboljšane sorte rastlin, še neuporabljene stranske proizvode živil ter alternativne vire beljakovin kot so žuželke in alge (EFSA, 2015). Glede na primerljivo hranilno sestavo bi žuželke lahko uporabljali namesto trenutno poznanih živalskih in rastlinskih beljakovin. Največja prednost pri reji žuželk je, da jih lahko vzrejamo na substratu slabše kakovosti (npr. organski ostanki) in pri tem pridobivamo kakovostne beljakovine (van Huis, 2013).

V zadnjih letih je v EU precej zanimanja za uporabo žuželk v prehrani ljudi in živali. Vendar je predhodno potrebno preučiti vsa poznana tveganja za zdravje ljudi in živali, med drugim je potrebno preučiti tudi potencialno alergenost. Poleg tega pa bi za rejo žuželk morala veljati enaka pravila glede zdravja in dobrobiti, kot veljajo za ostale rejne živali (EFSA, 2015).

Žuželke so naravna hrana mnogih živalskih vrst. Kot krmo jih uporabljajo v akvakulturah in v prehrani hišnih ljubljencev, predvsem plazilcev, ptic in ježev. V zadnjem času na tržišču zasledimo tudi hrano za pse, ki kot vir beljakovin vsebuje žuželke. Beljakovine žuželk bi lahko predstavljale nov vir beljakovin za pse, ki imajo neugodne reakcije na hrano, hkrati pa so zanimive iz ekološkega in etičnega vidika (Böhm in sod., 2018). Tveganje za alergijske reakcije na beljakovine žuželk je primerljivo s tveganjem za alergijske reakcije na pršice in morske sadeže (rake) in je ena od najbolj zaskrbljujočih potencialnih nevarnosti (van Huis, 2013). Pri ljudeh je že opravljenih nekaj raziskav, dokazana pa je tudi navzkrižna alergenost beljakovin morskih rakov in žuželk (Broekman in sod., 2016). Pri psih takšnih raziskav v nam dostopni literaturi nismo zasledili, zato je bil namen našega dela prispevati k področju

raziskav ugotavljanja potencialne alergenosti beljakovin žuželk, bolj natančno beljakovin mokažev (*Tenebrio molitor*).

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Hrana in krma, ki vsebujeta beljakovine žuželk, bi lahko povzročala alergijske reakcije, prav tako pa so možne navzkrižne reakcije z drugimi pomembnimi alergeni. Psi so pogosto alergični na pršice, ki jih v grobem delimo na hišne (*Dermatophagoides farinae* in *D. pteronyssinus*) in prehranske pršice. Najpogostejši predstavniki prehranskih pršic so *Acarus siro*, *Tyrophagus putrescentiae* in *Lepidoglyphus destructor*. V raziskavo smo vključili pse, ki smo jim določili imunoglobuline razreda E (IgE) proti *T. putrescentiae* in *A. siro*. Na osnovi kliničnega pregleda smo jih razdelili v dve skupini in jim odvzeli kri. V prvi skupini so bili psi s kliničnimi znamenji alergijske bolezni (21 psov), v drugi pa klinično zdravi psi (10 psov).

Med žuželkami, ki imajo v EU največji potencial za uporabo v namene prehrane ljudi in živali, smo izbrali velikega mokaža (*Tenebrio molitor*).

Razgradljivost beljakovin s prebavnimi encini je prvi test v postopku ugotavljanja alergenosti, zato smo beljakovine ličink mokažev najprej ekstrahirali, določili njihovo koncentracijo in elektroforezni profil. Nato smo jih razgradili z encimi; s pepsinom, tripsinom in α -kimotripsinom, ter dobljene fragmente primerjali med seboj na podlagi elektroforeznega profila. V vzorcih krvnih serumov psov smo z imunoblotom ugotavljali specifične vezave IgE na beljakovine mokažev.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

1. Specifična IgE proti prehranskih pršicam *T. putrescentiae* in *A. siro* bomo dokazali v serumih psov s kliničnimi znaki alergij. V serumih psov, ki ne kažejo kliničnih znakov alergijskih bolezni IgE pričakujemo v manjšem deležu.
2. Beljakovine mokarjev se bodo po razgradnji s prebavnimi encimi razgradile v produkte z nižjimi molekulskimi masami. Pričakujemo, da bodo razgradni produkti po delovanju pepsina, tripsina in α -kimotripsina nižjih molekulskih mas kot po razgradnji beljakovin samo s pepsinom.
3. Imunoblotti, pri katerih bomo kot antigen uporabili beljakovine mokarjev, se bodo razlikovali med seboj, če bomo testirali serume psov s kliničnimi znaki alergijske reakcije ali serume psov, ki ne kažejo kliničnih znakov alergijske reakcije

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ŽUŽELKE KOT VIR BELJAKOVIN V PREHRANI LJUDI IN ŽIVALI

V literaturi je opisanih več kot 2000 vrst užitnih žuželk. Prehranjevanje z žuželkami se imenuje entomofagija. Ljudje po celem svetu že stoletja vključujejo v svojo prehrano žuželke, najpogostejše hrošče, gosenice metuljev, čebele, ose, mravlje, kobilice, črčike, termite, muhe in njihove razvojne oblike. V razvitem svetu entomofagijo večinoma dojemamo z gnusom, vendar obstaja veliko razlogov, zakaj bi o žuželkah morali razmišljati kot o hrani prihodnosti (van Huis, 2013; EFSA, 2015; Grau in sod., 2017). Eden od ključnih razlogov je njihova hranilna vrednost. Zaradi visoke vsebnosti beljakovin in drugih hranilnih snovi so žuželke dobra alternativa živalskim in rastlinskim virom beljakovin, kot so perutnina, svinjina, govedina, ribe, jajca in soja (van Huis, 2013; Shockley in Dossey, 2014). Druge prednosti uporabe žuželk so (van Huis, 2013):

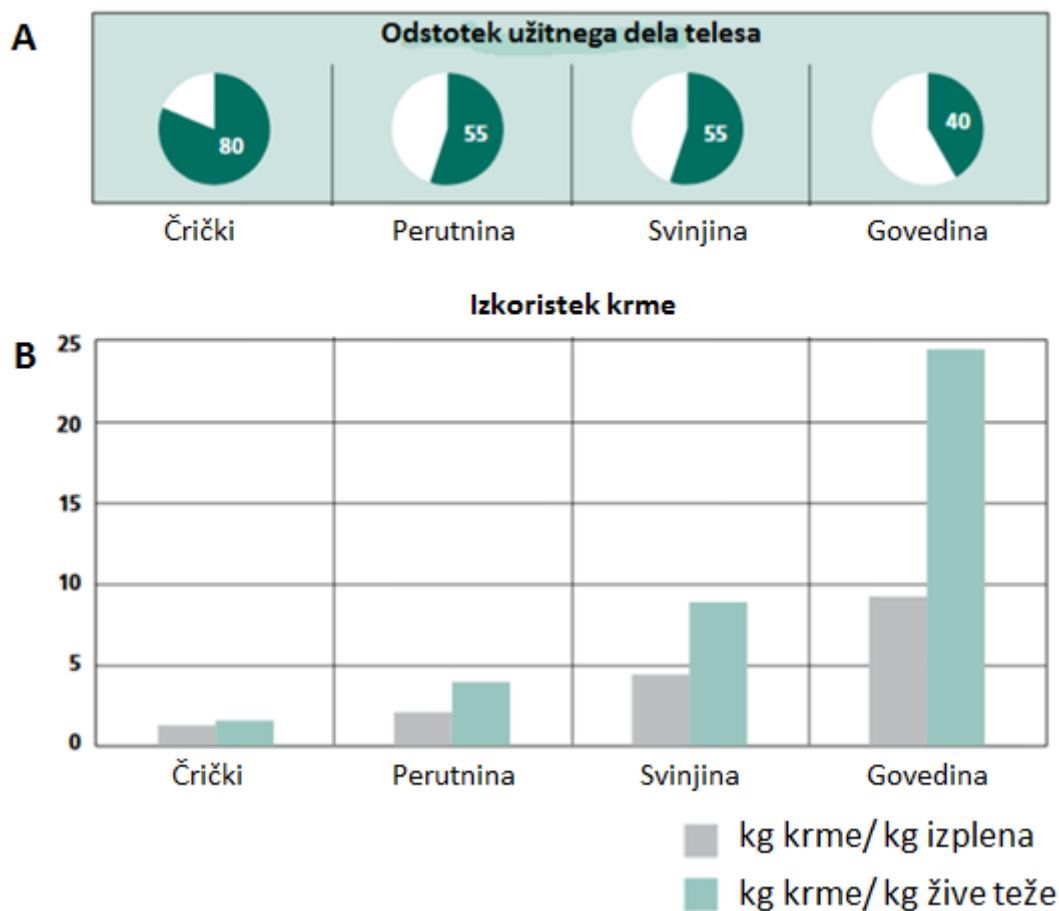
- Bogate so z beljakovinami, zdravimi maščobami, kalcijem, železom in cinkom.
- Pri vzreji žuželk nastaja mnogo manj toplogrednih plinov in amonijaka kot pri reji gospodarsko pomembnih živali.
- Žuželke potrebujejo zelo malo vode.
- Konverzija krme je izredno dobra.
- Če bi žuželke gojili na organskih odpadkih, bi zmanjšali onesnaževanje okolja.
- Za rejo žuželk ni potrebna visoka tehnologija in velika investicija, kot je to pri živinoreji.
- Stopnja tveganja za prenos zoonoz je majhna.

Žuželke so naravni vir beljakovin za perutnino, nekatere vrste rib in v določeni meri tudi za prašiče. S poskusi so dokazali, da prašiči enako dobro konzumirajo krmo s sojinimi beljakovinami kot z beljakovinami iz žuželk (Newton in sod., 2005). Tudi pri perutnini ni opisanih sprememb v ješčnosti, prirastu, konverziji krme, klavnih rezultatih in kvaliteti mesa, če so v krmo dodali beljakovine iz žuželk. Podobne rezultate opisujejo tudi pri poskusih s kunci in v akvakulturah (EFSA, 2015; Ramos - Elorduy in sod., 2002;).

V prehrani gospodarsko pomembnih živali se kot vir beljakovin najpogosteje uporabljata ribja moka in soja, ki imata dobro hranilno vrednost. Slabost uporabe je vedno višja cena in način njunega pridobivanja, ki močno bremeni okolje. Ribe in sojo uporabljamo tudi v prehrani ljudi, zato je smiselno za prehrano živali poiskati druge vire beljakovin. Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) je kot potencialni vir beljakovin v prehrani živali predlagala žuželke in tudi Evropska Komisija trenutno proučuje možnosti uporabe žuželk za prehrano živali. Pri rejnih živalih, kjer je končni uporabnik človek, se žuželke lahko uporabljajo le v akvakulturi (EFSA, 2015; van Huis, 2013). Drugače je pri hišnih živalih, kjer je uporaba žuželk dovoljena, zato se je na tržišču v zadnjem letu pojavila hrana za pse, ki vsebuje beljakovine žuželk.

2.2 PREDNOSTI REJE ŽUŽELK

Za prehrano lahko pri žuželah uporabimo bistveno večji odstotek telesne mase kot pri rejnih živalih. Pri črčkah je ta delež 80 %, pri perutnini in prašičih 55 % medtem, ko je pri govedu le 40 % (Nakagaki in DeFoliart, 1991). Konverzija krme je pri črčkah 1,7 kg krme za 1 kg žive teže (Collavo in sod., 2005), pri piščancih 2,5, pri prašičih 5 in pri govedu 10 (Smil, 2002). Vzrok boljše konverzije je verjetno dejstvo, da so žuželke hladnokrvne in ne potrebujejo energije iz krme za vzdrževanje telesne temperature (van Huis, 2013). Na splošno žuželke na manjši pridelovalni površini tudi do desetkrat bolje izkoristijo pretvorbo rastlinskih beljakovin v lastne beljakovine ter pri tem manj obremenjujejo okolje (Sun - Waterhouse in sod., 2016) (Slika 1).



Slika 1: Izkoristljivost žuželk (črčkov) v primerjavi z rejnimi živalmi. A: odstotek užitnega dela telesa različnih vrst živali; B: konverzija krme pri črčkih v primerjavi s perutnino, svinjino in govedino. Povzeto po van Huis, 2013.

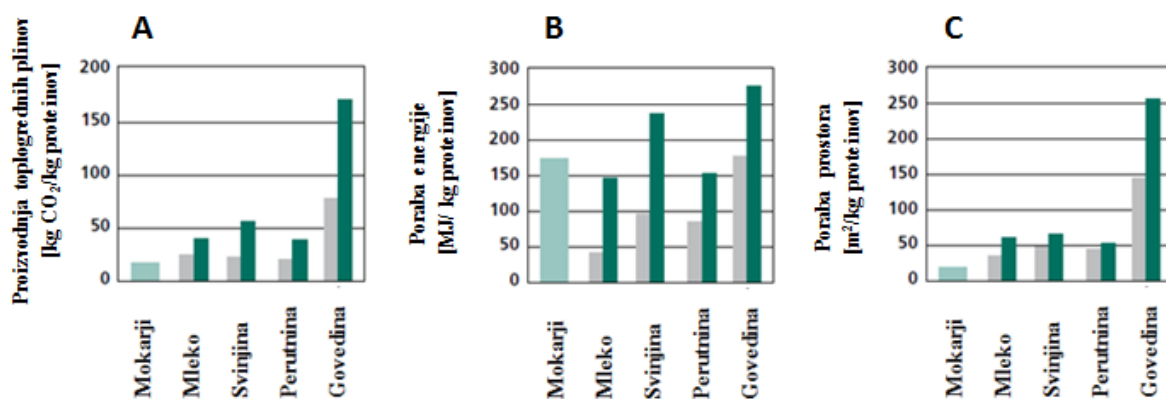
Figure 1: Efficiencies of production of conventional meat and crickets. A: percentage of edible part of the body of different animal species; B: feed conversion rate for crickets, poultry, pork and beef. Adopted from van Huis, 2013.

Velika prednost pri reji žuželk je, da jih lahko gojimo na organskih odpadkih, kar pomeni zelo nizke stroške prireje in hkrati zmanjševanje onesnaženosti okolja. Vendar po veljavni zakonodaji v EU trenutno ni dovoljeno rediti žuželk, ki so namenjene za prehrano ljudi ali za prehrano živali v prehranski verigi, na odpadni masi (van Huis, 2013). Uporabljajo se lahko samo krmila, dovoljena za uporabo pri rejnih živalih.

Po podatkih iz literature živinoreja v svetovnem merilu prispeva 18 % emisij toplogrednih plinov, od tega za kar 35 do 40 % emisij metana in 65 % emisij dušikovega dioksida (Steinfeld in sod., 2006). Optimizirana reja žuželk za namene prehrane ljudi in živali ima manjše emisije toplogrednih plinov in amoniaka ter nižjo porabo vode ob večji učinkovitosti

konverzije krme v beljakovine kot klasična živinoreja (Slika 2). Poleg tega pa je zanjo potrebna manjša denarna investicija (van Huis, 2013). Izraženo v številkah, žuželke v primerjavi z rejnimi živalmi izločajo okrog $100 \times$ manj toplogrednih plinov in $10 \times$ manj amonijaka (Oonincx in sod., 2010).

Če razmišljamo o preskrbi prebivalstva s hranilnimi snovmi v prihodnosti, ne moremo mimo vprašanja o vzdržnosti virov pitne vode. Po ocenah strokovnjakov je 70 % vse porabljene vode na svetu namenjeno za pridelavo poljščin za prehrano ljudi in živali (Pimentel in sod., 2004). V literaturi še ni podatkov o oceni porabe vode za gojenje žuželk, vendar naj bi bila mnogo nižja kot pri živinoreji, saj imajo žuželke manjše potrebe po vodi in so na pomanjkanje bolj odporne (van Huis, 2013).



Slika 2: Primerjava proizvodnje toplogrednih plinov (A), porabe energije (B) in porabe prostora (C) med molarji in ostalimi pogostimi viri beljakovin. Povzeto po van Huis, 2013.

Figure 2: Comparison of greenhouse gas production (A), energy use (B) and land use (C) among mealworms and conventional source of protein. Adopted from van Huis, 2013.

2.3 VELIKI MOKAR (*Tenebrio molitor*)

Veliki moka (*Tenebrio molitor*) je vrsta žuželke iz družine *Tenebrionidae*. Je škodljivca v moki in žitih. Razvojni cikel obsega štiri faze: jajčeca, ličinka, buba in odrasla žival (hrošč) (Ribeiro, 2017) (Slika 3). Samica v substrat izleže 400 do 500 jajčec, iz katerih se izležejo ličinke (larve). Hitrost izleganja larv iz jajčec je odvisna od temperature okolja in je 4 dni pri 26 do 30 °C in 34 dni pri 15 °C (Kim in sod., 2016). Obdobje ličinke traja od 57 dni v kontroliranem okolju (Weaver in McFarlane, 1990) do 629 dni v naravi. Ličinka se večkrat

levi (najmanj 9 ×, lahko pa vse do 23 ×). Po fazi ličinke, se le-ta zabubi in faza bube traja 6 do 20 dni (Hill, 2002). Mladi hrošči, ki se izležejo iz bube so beli in imajo mehak eksoskeleton, postopno pa počrni in eksoskeleton se ojača (Ribeiro, 2017). Tri dni po izleganju so sposobni leganja jajčec. Odrasel hrošč preživi 16 do 173 dni (Tatiana in sod., 2000). Celoten razvojni krog poteka v enem ekosistemu, trajanje posameznih faz pa je odvisno od temperature, relativne vlage, hrane, ki je na voljo in gostote populacije (Ribeiro, 2017). Optimalna temperatura je 25 do 27,5 °C (Fiore, 1960), optimalna vlaga nad 60 % (Manojlovic, 1987).

Mokarji so omnivori in običajno se jih goji na žitih ali moki z dodatkom beljakovinskega vira (sojina moka, mleko v prahu, pivski kvas). Dodaja se jim tudi sveže sadje in zelenjavo, ki služi kot vir vode (Ramos - Elorduy in sod., 2002).



Slika 3: Veliki mokaar (*Tenebrio molitor*) (lastna fotografija). A: odrasli mokaarji (hrošči). B: ličinke mokaarjev.

Figure 3: Yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) (author photography). A: adult mealworms (beetles). B: mealworm larvae.

Veliki mokaar je med ekonomsko najbolj pomembnimi vrstami žuželk, zato je tudi med užitnimi žuželkami najbolj raziskana vrsta (Grau in sod., 2017). Ličinke se pogosto uporablja za prehrano plazilcev in ptic, so pa vedno bolj zanimivi kot alternativni vir živalskih beljakovin za rejne živali, pse in mačke, ter tudi za ljudi (van Huis, 2013).

Obstajajo podjetja, ki intenzivno prirejajo mokaarje. Vodilno podjetje v EU je trenutno Ynsect v Parizu v Franciji, ki pridelava več ton biomase iz mokaarjev na teden (Grau in sod., 2017).

2.4 HRANILNA VREDNOST ŽUŽELK

Hranilna vrednost užitnih žuželk je spremenljiva, saj obstaja mnogo vrst, razlike pa so tudi med razvojnimi oblikami (npr. ličinke mokařev imajo 205,6 kcal/100 g sveže mase, medtem ko imajo odrasli surovi mokařji 137,8 kcal/100 g sveže mase) (FAO/INFOODS, 2017). Na hranilno vrednost žuželk vplivajo tudi okolje, prehrana ter obdelava pred zaužitjem (van Huis, 2013).

Vsebnost beljakovin v družini hroščev je med 23 in 66 % (Xiaoming in sod., 2010), ličinke velikih mokařev (*Tenebrio molitor*) jih vsebujejo 14 do 25 % (Tabela 1) (FAO/ INFOODS, 2017). Žuželke so dober vir maščob, med njimi je veliko večkrat nenasičenih maščobnih kislin, predvsem linolne in α -linolenske maščobne kisline (Womeni in sod., 2009). So tudi bogat vir železa in cinka ter vsebujejo vitamine B kompleksa. Niso najboljši vir vitamina A, so pa relativno dober vir vitamina E. Žuželke vsebujejo tudi veliko vlaknin, predvsem hitina (van Huis, 2013).

Tabela 1: Primerjava hranilne vrednosti ličink velikega mokařja (*Tenebrio molitor*) in govejega mesa (van Huis, 2013)

Table 1: Comparison of nutritional value of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and beef meat (van Huis, 2013)

	Ličinke mokařja	Govedina
Vlaga (%)	61,9	52,3
Beljakovine (v 100 % suhe snovi)	49,1	55,0
Maščobe (v 100 % suhe snovi)	35,2	41,0
Energijska vrednost (kcal/kg)	2056	2820

Hranilna vrednost mokařev, ribje in sojine moke je zelo podobna. Podobni so si tudi po vsebnosti esencialnih maščobnih kislin, zato so mokařji dobra alternativa beljakovinskega vira hrane za živali (Tabele 2 - 4) (Makkar in sod., 2014).

Ličinke mokařev vsebujejo v suhi snovi veliko surovih beljakovin (47 do 60 %) in maščob (31 do 43 %). Sveže ličinke vsebujejo 60 % vode. Pepela je relativno malo (< 5 % v suhi snovi) in kot vse žuželke imajo nizko vsebnost kalcija in zelo neugodno razmerje

kalcij:fosfor. Vsebnost esencialnih maščobnih kislin je ugodna. Zavedati se moramo, da se lahko vrednosti hranilnih snovi razlikujejo glede na substrat, na katerem gojimo mokaerje (Makkar, 2014).

Tabela 2: Vsebnosti hranilnih snovi v ličinkah mokaerjev (Siemianowska in sod., 2013; Finke, 2002)

Table 2: Nutrient content in mealworm larvae (Siemianowska et al., 2013; Finke, 2002)

Hranilna snov	Vsebnost
Vlaga (% v svežih mokaerjih)	56,27 ± 0,127
Beljakovine (% v suhi snovi)	44,72 ± 0,433
Maščobe (% v suhi snovi)	42,48 ± 0,808
Nebeljakovinski ekstrakt (% v suhi snovi)	8,49
Vlaknina topna v nevtralnem detergentu (% v suhi snovi)	14,9
Vlaknina topna v kislem detergentu (% v suhi snovi)	7,86
Pepel (% v suhi snovi)	3,69 ± 0.481
Metabolna energija (kcal/kg suhe snovi)	2056

Tabela 3: Vsebnost mineralov v ličinkah mokaerjev (Siemianowska in sod., 2013)

Table 3: Mineral content in mealworm larvae (Siemianowska et al., 2013)

Mineral	mg/100 g suhe snovi
Kalcij (Ca)	3,69 ± 0,481
Fosfor (P)	700,2 ± 40,29
Natrij (Na)	81,1 ± 4,66
Kalij (K)	726,6 ± 41,86
Magnezij (Mg)	144,6 ± 4,65
Cink (Zn)	8,2 ± 0,380
Železo (Fe)	4,10 ± 0,198
Baker (Cu)	1,19 ± 0,088
Mangan (Mn)	0,82 ± 0,093

Tabela 4: Aminokislinska sestava ličink mokařjev (Makkar in sod. 2014; Finke, 2012; Jones in sod., 1972)

Table 4: Aminoacid composition in mealworm larvae (Makkar et al., 2014; Finke, 2012; Jones et al., 1972)

Aminokislina	g/16 g duřika
Alanin	7,3 ± 1,0
Arginin	4,8 ± 1,0
Aspartanska kislina	7,5 ± 1,7
Cistin	0,8 ± 0,0
Metionin	1,5 ± 0,4
Lizin	5,4 ± 0,8
Izolevcin	4,6 ± 0,5
Levcin	8,6 ± 1,8
Fenilalanin	4,0 ± 0,4
Treonin	4,0 ± 0,5
Triptofan	0,6 ± 0,5
Glutamatska kislina	11,3 ± 1,1
Histidin	3,4 ± 0,2
Prolin	6,8 ± 0,2
Derin	7,0 ± 3,5
Glicin	4,9 ± 0,9
Tirozin	7,4 ± 0,3
Valin	6,0 ± 0,6

2.5 TVEGANJA PRI UPORABI ŽUŽELK V PREHRANI LJUDI IN ŽIVALI

Vse vrste žuželk niso varne za prehrano, zato moramo pri izbiri žuželk za namene prehrane ljudi in živali upoštevati mikrobiološka, kemična, fizikalna, alergijska, parazitarna in toksikološka tveganja, ki jih vnos novega prehrarnega vira predstavlja. V celotnem procesu od prireje do končne uporabe morajo biti tveganja čim manjša (Sun - Waterhouse in sod., 2016).

Evropska komisija je na podlagi regulative 178/2002 zaprosila Evropsko agencijo za vrano hrano (EFSA), da preuči morebitna mikrobiološka, kemijska in okoljska tveganja pri reji in uporabi žuželk za prehrano ljudi in živali. EFSA je v zaključku navedla, da trenutno še ni znano ali žuželke in hrana narejena iz njih prinaša prednosti ali slabosti glede vsebnosti hranil v primeru, da bi bili zaužiti v količinah, potrebnih za preživetje. Prav tako še niso raziskani morebitni negativni vplivi, npr. vpliv na resorpcijo hranil iz prebavnega trakta (EFSA Scientific Committee, 2015). Zaenkrat še ni bilo opravljenih dovolj raziskav, da bi lahko potrdili ali ovrgli možnost prenosa zoonoz. Ker so žuželke po taksonomiji daleč od sesalcev raziskovalci sicer predvidevajo, da je možnost prenosa zoonoz nizka, so pa žuželke lahko potencialni vektor nekaterih bolezni (van Huis, 2013).

2.5.1 Mikrobiološka tveganja

Žuželke vsebujejo veliko hranilnih snovi in vode, zato so primerno okolje za rast in razmnoževanje mikroorganizmov (van Huis, 2013; Klunder in sod., 2012). Lahko so vrstno okužene s patogenimi mikroorganizmi, vendar pa ti mikroorganizmi niso patogeni za vretenčarje, saj se taksonomsko razlikujejo (Jensen in sod., 1977). Tudi črevesna mikroflora žuželk praviloma ne predstavlja tveganja, prav tako ne saprofiti, ki živijo na površini kutikule. Vendar pa lahko ti mikrobi prispevajo h kvarjenju hrane oziroma krme iz žuželk, zato jih je potrebno obravnavati kot mikrobiološke kontaminante, še posebej, ker žuželke v večini primerov za prehrano uporabljamo cele. V hrani oziroma krmi iz žuželk lahko najdemo mikroorganizme, ki so pogojno patogeni ali patogeni za sesalce (*Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., enterobakterije, ...), kar je posledica kontaminacije iz okolja (EFSA Scientific Committee, 2015).

Normalno mikrofloro žuželk predstavljajo bakterije iz rodov *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* in *Acinetobacter* (Braide in sod., 2011; Agabou and Alloui, 2010; Amadi in sod., 2005; Giaccone, 2005). Bakterijska tveganja za ljudi in živali bodo predstavljale za žuželke saprofitske vrste bakterij, ki bodo povezane s pogoji reje, procesiranjem in shranjevanjem živil in krme (ANSES, 2015). Nekateri užitni insekti vsebujejo antibakterijske peptide, na primer peptid Hf-1, ki inhibira izražanje genov pri bakterijskih patogenih kot so *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, ipd. Dosedanje raziskave so bile večinoma narejene na žuželkah, gojenih v tradicionalnih načinih

reje. Gojenje za namene prehrane ljudi in živali v EU bi nedvomno omogočilo večji nadzor nad higieno in prehrano žuželk ter obdelavo in skladiščenjem proizvodov, kar bi znižalo stopnjo tveganja za mikrobiološko kontaminacijo (van Huis, 2013).

Žuželke lahko prenašajo veliko različnih virusov, od katerih so mnogi patogeni le za žuželke. Virusi so specifični za živalske družine ali vrste, zato tisti, ki so patogeni le za nevretenčarje, ljudem in ostalim vretenčarjem niso nevarni. Predstavljajo pa resno tveganje uspešnosti proizvodnje insektov, ki jih gojimo v prehranske namene (Eilenberg in sod., 2015). Nekaterim virusom žuželk so taksonomsko sorodne vrste virusov vretenčarjev, na primer poksvirusi, parvovirusi, pikornavirusi, ortomiksovirusi, rabdovirusi, reovirusi in iridovirusi. Predstavniki, ki so patogeni za vretenčarje, se v žuželah ne replicirajo, zato aktiven prenos preko vektorskih žuželk na vretenčarje ni možen. Dokazano je, da se densovirusi čričkov (*Parvoviridae*) in virusi entomopoks ne morejo replicirati v celicah vretenčarjev, čeprav so sorodni virusom, ki so patogeni za vretenčarje (El Far in sod., 2004; Li in sod., 1997).

V nekaterih primerih se virusi lahko pomnožujejo tako v vretenčarjih, kot nevretenčarjih, ter se prenašajo iz enih na druge. To so arbovirusi, katerih predstavniki povzročajo obolenja pri ljudeh (npr. denga, bolezen Zahodnega Nila in farmskih živalih (Schmallenberg)). Zaenkrat ni znanstvenih dokazov o pojavljanju teh virusov v žuželah gojenih za prehranske namene (EFSA, 2015).

Žuželke lahko prenašajo oziroma so občutljive na entomopatogene glive, ki izločajo specifične žuželkam strupene toksine. Nekatere od teh gliv uporabljajo v namene bionadzora škodljivcev poljščin in praviloma ljudem niso škodljive, razen v redkih primerih pri ljudeh s slabšim imunskim odzivom (Strasser in sod., 2000; Goettel in sod., 2001). Žuželke lahko tudi prenašajo glive, ki so potencialno škodljive vretenčarjem, zato je zelo pomembna pravilna predelava in shranjevanje žuželk pred zaužitjem (EFSA, 2015).

Pri žuželah, namenjenih za prehrano ljudi, so izolirali tudi mikotoksigene glive *Aspergillus* spp. in *Penicillium* spp. Mikotoksini v žuželah lahko izvirajo iz substrata ali pa se tvorijo v prebavnem traktu žuželk. V hišnih muhah so odkrili mikotoksine beauvericin, enniatin A in enniantin A1 (Charlton in sod., 2015). V larvah mokaarjev so dokazali mikotoksin deoksinivalenol (DON) in njegove derivate (van Broekhoven, 2014).

2.5.2 Parazitarna tveganja

Tveganje za parazitarni bolezni obsega prenos sesačev, ehinokokoze, nematodov, protozojev, tripanosomiaz in prenos ličink dvokrilcev (komarji, mušice in muhe) (Sun-Waterhouse in sod., 2016; Pereira in sod., 2000). V žužkah lahko najdemo različne parazite, vendar pa so podatki v literaturi večinoma iz območij izven EU. V zaprtih pogojih reje se zniža možnost za prenos, saj ni vseh potrebnih gostiteljev, ki jih paraziti potrebujejo za svoj razvojni krog. Obdelava žužek pred zaužitjem z zamrzovanjem ali kuhanjem še dodatno znižuje možnosti za infestacijo (EFSA, 2015).

Trakulja *Hymenolepis diminuta*, katere končni gostitelj je podgana, lahko pa tudi ostali sesalci, kot so rejne živali in človek, ima za vmesnega gostitelja žuželke, vključno z žužkami, ki jih štejemo za užitne (Shostak, 2014).

Potencialno parazitarno nevarnost predstavljajo tudi praživali. Iz žužek so bili izolirani *Entamoeba histolytica* in *Giardia lamblia*, pa tudi *Toxoplasma* spp. in *Sarcocystis* spp. (EFSA, 2015).

2.5.3 Tveganje za prionske bolezni

Evropska regulativa glede živalskih stranskih proizvodov je primarno osredotočena na nevarnost nastanka prionskih bolezni. Prionske beljakovine ne morejo biti izražene v genomih žužek (Thackray in sod. 2012), vendar pa bi žuželke po zaužitju prionskih beljakovin lahko postale prenašalke do končnega gostitelja (Lupi, 2006). Vektorstvo prionov je torej pri žužkah odvisno le od okolja oziroma krme, na kateri jih gojimo (van Raamsdonk in sod., 2017).

2.5.4 Kemijska tveganja

Kemijska tveganja predstavljajo snovi, ki:

- se naravno pojavljajo v žuželah (skombrotoksin, ciguatoksin, tetrodoksin, pirolizidin alkaloidi, patulin, fitohemaglutinin, toksini paralitične, diaretične, nevrotoksične in amnestične »shellfish« zastrupitve),
- se sintetizirajo in akumulirajo v telesih žuželk,
- so povezana s skladiščenjem škodljivih snovi iz okolja v telesu žuželk,
- nastanejo pri predelavi in skladiščenju živil iz žuželk.

Žuželke lahko vsebujejo strupe, ki jih sintetizirajo same ali pa jih akumulirajo iz substrata, kar jim je v naravi omogočilo preživetje vrste. Nekatere žuželke so po zaužitju strupene, če niso primerno obdelane (na primer s toploto), pri nekaterih pa so strupeni le posamezni deli telesa in so žuželke po odstranitvi le-teh primerne za zaužitje (van Huis, 2013).

Za vrste, ki imajo v EU največji potencial za uporabo v namene prehrane ljudi in živali velja, da ne izločajo reaktivnih, dražečih ali strupenih substanc v razvojni stopnji, ki je predvidena za zaužitje (FASFC, 2014). Te vrste so: *Musca domestica*, *Hermetia illucens*, *Tenebrio molitor*, *Zophobas atratus*, *Alphitobus diaperinus*, *Galleria mellonella*, *Achroia grisella*, *Bombyx mori*, *Acheta domesticus*, *Gryllodes sigillatus*, *Locusta migratoria migratorioides*, *Schistocerca Americana* (EFSA, 2015).

Različne snovi se v žuželah lahko akumulirajo v maščobnem tkivu, eksoskeletonu, reprodukcijskih organih in v prebavnem traktu. Žuželke lahko akumulirajo toksične elemente (svinec, kadmij, merkurij), pesticide, nitrate in nitrite, mikotoksine, fungicide, rastlinske strupe, veterinarska zdravila in dioksine. Nekatere vrste žuželk tudi same tvorijo toksine, antinutritivne substance, encime, fenole in steroide (npr. mokaerji proizvajajo benzokinone in alkene, nekateri rodovi več proizvajajo cianogene glikozide) (EFSA, 2015).

V primeru, da so v substratu ostanki veterinarskih zdravil, obstaja možnost, da jih najdemo tudi v žuželah, gojenih na takem substratu. Prav tako lahko pričakujemo ostanke antimikrobnih in drugih veterinarskih zdravil v primeru zdravljenja žuželk. Trenutno se veterinarska zdravila za namene zdravljenja žuželk po svetu uporablja le v reji sviloprejk in čebelarstvu. Med je edini proizvod žuželk, za katerega so predpisane mejne vrednosti

ostankov (MRL - maximum residue level) za nekaj veterinarskih zdravil (Uredba Komisije (EU) št.37/2010 z dne 22. decembra 2009 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora). V znanstveni literaturi je objavljena uporaba antimikrobnih zdravil za zdravljenje bakterijskih in glivičnih bolezni, ki lahko resno ogrozijo kolonije gojenih insektov (Eilenberg in sod., 2015).

Žuželke, ki bi bile za prehrano gojene v kontroliranem okolju, predstavljajo mnogo manjše kemijsko tveganje kot tiste iz narave (van Huis, 2013; van Raamsdonk in sod. 2017; Sun - Waterhouse in sod., 2016).

2.5.5 Tveganja za alergije

Pred pojavom vsake nove hrane na trgu je potrebno raziskati tveganja za pojav alergijskih reakcij. Alergijske reakcije se lahko pojavijo pri osebkih, ki so že senzibilizirani na antigene žuželk, kot posledica navzkrižnih reakcij z drugimi sorodnimi alergeni ali pa kot »*de novo*« senzibilizacija. Ocena tveganja predvidi možnost pojava alergijskih reakcij glede na vir in sestavo hrane, informacij iz literature in eksperimentalnih podatkov (EFSA, 2015).

Kot večina beljakovinske hrane lahko antigeni žuželk (členonožcev) povzročijo alergijske reakcije pri senzibiliziranih osebkih. Te reakcije se klinično kažejo kot ekcemi, dermatitis, rinitis, konjunktivitis, angioedem, bronhialna astma in prebavne motnje. Najbolj znane alergijske reakcije so tiste, ki jih povzročijo piki žuželk. Alergijske reakcije lahko povzroči tudi sam stik z žuželkami, inhalacija (na primer njihov prah, dlačice, iztrebki ...) in zaužitje (van Huis, 2013).

Alergenost žuželk je podobna alergenosti školjk in bi lahko bila povezana z alergijo na členonožce in nevretenčarje, ki jo povzročajo njihova tkiva, kot so hemolimfa, kutikula, levek, dlačice in luske (Sun-Waterhouse in sod., 2016). Pri ljudeh je bila po zaužitju žuželk dokazana senzibilizacija, potrjene pa so tudi alergijske reakcije in celo anafilaktični šok (Freye in sod., 1996). Pri psih takšne raziskave še niso opravljene, čeprav proizvajalci hrano z beljakovinami žuželk označujejo kot hipoalergeno in monoproteinsko. Hrana z vsebnostjo žuželk bi lahko predstavljala nov vir beljakovin za pse, ki imajo neugodne reakcije na konvencionalno hrano (Böhm in sod., 2018).

Med vrstami žuželk se pojavlja navzkrižna reaktivnost, kar pomeni, da se protitelesa za specifičen antigen (alergen) ene vrste žuželk vežejo na antigene (alergene) drugih vrst žuželk (van Huis, 2013). Dokazana je tudi možnost navzkrižne reakcije med hišnimi pršicami, ki vsebujejo alergen tropomiozin »Der p 10« in velikim mokařem. Navzkrižno reaktivnost povzroča tropomiozin pa tudi arginin kinaza, triozařosfat izomeraza in tubulin (Verhoeckx in sod., 2014).

Dokazali so tudi, da protitelesa proti arginin kinazi v črčkah (*Gryllus bimaculatus*), navzkrižno reagirajo z antigeni arginin kinaze sladkovodnih kozic *Macrobrachium* spp. (Srinroch in sod., 2015). Ljudje, alergični na antigene kozic, pa alergično reagirajo tudi na antigene velikih mokařev v prehrani (Broekman in sod., 2016).

2.6 ALERGENI V ŽUŽELKAH

Užitne žuželke, morski sadeži in oreščki so vsi bogati z beljakovinami, nenasičenimi maščobnimi kislinami, vlakninami, vitamini, minerali in steroli. Alergijsko reakcijo lahko sproži velika količina alergenih peptidov skupaj z interaktivnimi komponentami (lipidi in ioni, kot je Cu^{2+}). Beljakovine z večjo toplotno stabilnostjo, odpornostjo na proteolizo in sposobnostjo vezave z lipidi in/ali ioni (Cu^{2+}) običajno kažejo večjo alergenost (Sun-Waterhouse in sod., 2016; Breiteneder in Mills, 2005). Toplotna obdelava ne zniža alergenosti beljakovin iz ličink mokařev (Broekman in sod., 2015).

Snovi, ki povzročajo alergijske reakcije, so intrinzične beljakovine (npr. tropomiozin), ogljikovi hidrati (npr. hitin) ali druge, še nepoznane molekule (Sun-Waterhouse in sod., 2016).

Tropomiozini so aktin-vezujoče beljakovine s številnimi izoformami, ki regulirajo krčenje mišic. Najdemo jih v mišicah, pa tudi v ne-mišičnih tkivih vseh živali. So termostabilni alergeni, velikosti 32 do 39 kDa in helične strukture. Tropomiozini iz žuželk, pršic in rakcev so dokazano alergeni in povzročajo navzkrižno reaktivnost (van Huis, 2013; Reese in sod., 1999). Tropomiozin in paramiozin sta glavna beljakovinska alergena pri školjkah. Majhne strukturne razlike tropomiozina pri različnih vrstah školjk so vzrok za navzkrižno antigensko

aktivnost in klinično navzkrižno alergenost (Sun - Waterhouse in sod., 2016; Leung in sod., 1996).

Arginin kinaza je encim, ki ga pogosto najdemo pri nevretenčarjih. Alergijske navzkrižne reakcije so poznane med antigeni arginin kinaze, ki jo najdemo v raki, pršicah, metuljih in ščurkih (Verhoeckx in sod., 2014).

Hitin je drugi najpogostejši polisaharid v naravi. Najdemo ga v nižje razvitih organizmih, kot so glive, raki in žuželke. Raziskave kažejo, da je alergen (Muzzarelli, 2010), vendar pa imajo hitin in njegovi derivati antivirusne, antitumorske in imunomodulatorne lastnosti, ker vzpodbujajo nespecifično obrambo organizma ter povečujejo imunske sposobnosti (van Huis, 2013). Zaradi imunomodulatornih lastnosti bi lahko sprožil tudi navzkrižne alergijske reakcije na druge alergene (EFSA, 2015). Po mnenju EFSA zaužitje 5 g hitin-glukana iz rakov ne povzroča tveganja za javno zdravje (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2010).

2.7 NETOLERANCA IN PREOČUTLJIVOST ZA HRANO PRI PSIH

Neugodna reakcija na hrano (angl. »adverse food reaction«) je klinično nenormalen odziv organizma na zaužitje hrane ali prehranskega dodatka. Pri tem lahko posreduje imunski sistem (preobčutljivost za hrano) ali pa je mehanizem neimunološki (netoleranca, neprenašanje hrane) (Kotnik, 2016a).

Bolezni preobčutljivosti navadno razvrščamo na osnovi poglavitnih imunskih mehanizmov, vključenih v njihov nastanek. Za takojšnjo preobčutljivost ali preobčutljivost tipa I štejemo skupek patoloških sprememb, ki jih povzročajo škodljive snovi iz mastocitov in bazofilnih granulocitov. Mehanizem takojšnje preobčutljivosti je tesno povezan s sintezo imunoglobulinov E, specifičnih za nekatere antigene iz okolja, in vezavo teh Ig na mastocite v različnih tkivih. Takojšnje preobčutljivostne reakcije imenujemo tudi alergije ali atopije. Tudi Ig drugih razredov lahko povzročajo bolezni preobčutljivosti. Tista, ki so usmerjena v tkivne ali celične antigene, lahko poškodujejo ta tkiva ali celice in oslabijo njihovo delovanje, kar vse skupaj imenujemo preobčutljivost tipa II. Včasih pa Ig proti topnim antigenom lahko s temi antigeni oblikujejo imunske komplekse, ki se kopičijo v krvnih žilah različnih tkiv,

povzročajo vnetje in poškodbe. Tovrstne bolezni imenujemo bolezni imunskih kompleksov ali preobčutljivost tipa III. In nazadnje, nekatere bolezni so posledica delovanja limfocitov T, usmerjenih proti lastnim tkivnim antigenom. Te bolezni razvrščamo v preobčutljivost tipa IV (Jurca, 2003).

Preobčutljivost za hrano je lahko nesezonsko srbeče kožno obolenje, ki je posledica alergijske reakcije na eno ali več substanc, ki jih psi v organizem vnesejo s hrano. Čeprav so v literaturi opisane posamezne vrste hrane, za katere so psi pogosto preobčutljivi, je to najverjetneje povezano s tem, da so nekatere vrste hrane v jedilniku zastopane pogostejše. Na to vplivata cena in dostopnost sestavine. Avstralski psi so najpogostejše hranjeni z ovčetino, evropski pa z govedino in piščancem. Pes se lahko senzibilizira le na tiste sestavine, s katerimi prihaja v stik. Preobčutljivost za hrano poteka kot preobčutljivostna reakcija tipa I, III ali IV. Za razliko od preobčutljivosti za hrano je neprenašanje (netoleranca) hrane fiziološka reakcija na neko kemično sestavino v hrani. Reakcija je lahko metabolna, farmakološka, toksična ali idiosinkratična (Kotnik, 2016a).

Klinično se preobčutljivost za hrano pri psih lahko kaže enako kot atopijski dermatitis. Bolezen se pojavi pri mladih psih, pogosto jo spremlja vnetje ušes, srbeča koža uhljev, pazduh, ingvinalnega področja in distalnih delov okončin. Spremljajo jo lahko sekundarne bakterijske in glivične okužbe. Ponavljajoče se gnojno vnetje kože, ki ga spremlja srbež, je lahko edini znak preobčutljivosti za hrano. Starostna ali spolna predispozicija ni izražena. Bolezen ugotavljamo v katerem koli obdobju leta in ni tipično vezana na nedavno spremembo prehrane. Gastrointestinalni znaki (bruhanje, mukozna do hemoragična driska in napet trebuh) se po nekaterih podatkih pojavljajo pri do 15 % psov, ki so preobčutljivi za hrano. V majhnem številu primerov pri psih (3 %) se bolezen lahko kaže izključno v gastrointestinalni obliki. Poleg simptomov vnetja kože in prebavnega trakta so včasih prisotni tudi znaki obolenja respiratornega sistema in centralnega živčnega sistema. Pomembno je, da so gastrointestinalni znaki lahko prisotni pri do 25 % primerov drugih bolezni, ki povzročajo srbeče kožno obolenje (atopijski dermatitis, alergija na boljši pik). Preostali simptomi, s katerimi se kaže neprenašanje hrane, so odklanjanje hrane (»food aversion«, psihološko izogibanje) ter požrešnost (»gluttony«), mrhovinarstvo (»scavenging«) in alotriofagija (pica), ki jih uvrščamo v t. i. prehransko nepremišljenost (»dietary indiscretion«) (Kotnik, 2016a).

Preobčutljivost lahko povzroči katerakoli osnovna sestavina hrane, vendar so največkrat vzrok beljakovine. Ni znano, kje na svoji poti od zaužitja do presnove beljakovine senzibilizirajo organizem; možno je, da ga senzibilizirajo kot beljakovine ali pa kasneje, ko so beljakovine že delno razgrajene v peptide. Določeno vlogo pri tem imajo lahko črevesni zajedavci ali virusne okužbe, ki poškodujejo črevesno sluznico in omogočijo lažje prehajanje alergenov skozi mukozo. Histološko se bolezen gastrointestinalnega trakta odraža kot eozinofilni gastroenterokolitis ali plazmocitno-limfocitni enterokolitis. Reakcija na zaužito hrano je lahko takojšnja (v nekaj minutah ali urah) ali zakasnela (več ur ali celo dni) (Kotnik, 2016a).

Po podatkih iz literature (Mueller in Olivry, 2018; Olivry in Mueller, 2019) so psi v kar 80 % preobčutljivi za govedino in / ali kravje mleko. Redko so hkrati preobčutljivi za več sestavin hrane. Nadaljnjih 5 % zajame preobčutljivost za žitarice (pšenica, soja), 5 % preobčutljivost za aditive, sporadične pa so preobčutljivosti za svinjino, konjsko meso, piščančje meso, jajca, ribe in z glivami okuženo vodo. Različni avtorji navajajo nekoliko različne ugotovitve, na kar v veliki meri vplivajo različne prehranske navade v različnih deželah. Pomembna je še ugotovitev, da približno 20 % preobčutljivih psov ne tolerira nobene komercialne hrane, vključno s hipoalergenimi dietami, in morajo živeti ob doma pripravljeni hrani (Kotnik, 2016a).

2.8 METODE UGOTAVLJANJA ALERGENOSTI BELJAKOVIN V HRANI

Kot merilo za določanje navzkrižne reaktivnosti se uporablja veliko različnih antigenov in jih je potrebno z *in vitro* ali z *in vivo* metodami dodatno preučiti. Le živila, pridobljena iz žuželk, za katera bomo lahko dokazali, da ne predstavljajo tveganja za zdravje živali ali ljudi, se bodo v prihodnosti lahko uporabljala za prehrano. Raziskave, ki se na tem področju opravljajo, vključujejo študije ugotavljanja navzkrižne reaktivnosti z znanim alergenom, nadalje občutljivost na pH, toplotno stabilnost, ipd. (EFSA, 2015).

Za preverjanje alergenosti novih virov beljakovin bi potrebovali preiskušene in standardizirane metode, vendar takšnih metod zaenkrat še ni. Večinoma uporabljamo metode kot so imunoblot, BAT (Basophil Activation Test; test aktivacije bazofilcev) in SPT (Skin Prick Test; kožni test). Trenutna strategija temelji na pristopu zanesljivosti dokazov (weight

of evidence approach), ki vključuje izvor beljakovine, homolognost določenih sekvenc z znanimi alergeni, vezavo IgE v serumih alergičnih pacientov in stabilnost beljakovin v preizkusu odpornosti na delovanje prebavnega encima pepsina. Nove beljakovine se preverja enako kot gensko spremenjeno hrano. Odpornost beljakovin na razgradnjo s pepsinom je predlagana kot kriterij za uvrstitev beljakovine med potencialne alergene. Vendar so do danes ugotovili, da odpornost beljakovine na razgradnjo s pepsinom ni vedno v povezavi z njeno alergenošjo; mednarodno priznanega protokola za potrditev alergenoosti trenutno ni (Verhoeckx in sod., 2014; Broekman, 2017).

2.9 METODE UGOTAVLJANJA ALERGENOSTI HRANE PRI PSIH

Edini razmeroma zanesljiv diagnostični postopek je preizkus z eliminacijsko dieto, ki traja 10 do 12 tednov. Serološki testi niso nadomestilo za preizkus z eliminacijsko dieto, saj meritve IgE in IgG, specifičnih za alergene hrane v serumu obolelih psov niso v korelaciji s kliničnim odzivom, po drugi strani pa zvišane vrednosti protiteles lahko izmerimo tudi pri nekaterih zdravih psih. Protitelesa so udeležena le pri tipu I alergijske reakcije, medtem ko sta pri preobčutljivosti na hrano udeležena še tip III in tip IV preobčutljivostne reakcije. Zaradi tega razloga v klinični diagnostiki preobčutljivosti na hrano niso uporabni tudi intradermalni testi (Kotnik, 2016a).

Ustrezno eliminacijsko dieto sestavimo na podlagi podatkov, s katerimi sestavinami je bil pes v življenju hranjen. Na voljo so komercialno pripravljene diete in doma pripravljene diete. Slednje veljajo za zlati standard in so boljše od komercialno pripravljenih, saj so individualno prilagojene. Žal so zaradi zamudnosti priprave za nekatere lastnike nesprejemljive. Dokazano je, da nekateri psi doma pripravljene sestavine prenašajo, enakih sestavin v obliki komercialnih diet pa ne. Vzrok je lahko v aditivih, ki jih dodajajo v času priprave komercialnih diet. Dodatno tveganje pomeni okuženost briketirane hrane s prehranskimi pršicami vrst *Acarus siro*, *Tyrophagus putrescentiae* in *Lepidoglyphus destructor*. Do okužbe s pršicami lahko pride že na proizvodni liniji. Antigeni prehranskih pršic so namreč zelo pogosto alergeni (Kotnik, 2016a).

Kožni alergijski test je pomožna metoda, s pomočjo katere ob upoštevanju anamneze in klinične slike diagnosticiramo atopični dermatitis, alergijo na prehranske pršice in alergijo na boljši pik. Po podatkih Klinike za male živali Veterinarske fakultete v Ljubljani so psi najpogosteje alergični na antigene hišnih in prehranskih pršic (80 %), človeške kože (43 %), hišnega prahu (39 %) in hišne plesni (32 %), zatem pa na antigene trave (12 %) in različnih dreves (12 %). Pozitiven rezultat testiranja potrjuje le, da je žival na določene alergene senzibilizirana (Kotnik, 2016b).

Serološko testiranje na alrgijo pogosto uporabljamo v obravnavi psov z alergijsko boleznijo. Vpliv zdravil na rezultate testiranja je manjši kot pri intradermalnem testiranju in med samim postopkom ne tvegamo nastanka anafilaktične reakcije, ki se lahko razvije pri intradermalnem testiranju. Potrebujemo le zadostno količino krvi, iz katere pripravimo serum in vzorec pošljemo na preiskavo v specializiran laboratorij. Laboratorij določi nivo specifičnih protiteles razreda E in razreda G na izbrane alergene (Kotnik, 2016b).

2.10 PREOBČUTLJIVOST NA PRŠICE

Psi so pogosto preobčutljivi na prehranske pršice, ki spadajo v družini *Glycyphagidae* in *Acaridae* – to so *Tyrophagus*, *Acarus* in *Glyciphagus* – in so glavni vir okoljskih alergenov za pse z atopičnim dermatitisom (Nuttall in sod., 2006; Hill in DeBoer, 2001; Vollset in sod., 1986). Najdemo jih tudi v senu, slami, žitih in suhi hrani (Arlan in sod., 2003; Thind in Clarke, 2001; Thind, 2000;). Skupaj s hišnimi pršicami so alergeni prehranskih pršic glavni razlog za alergije tudi pri ljudeh (Vidal in sod., 2004; Van Hage - Hamsten in Johansson, 1998). V gospodinjstvih, kjer prebivajo psi in v tistih, kjer živali nimajo, najpogosteje najdemo hišno pršico *Dermatophagoides pharinae*, manj pogosta je *Dermatophagoides pteronyssus* (Farmaki in sod., 2012). Obstaja možnost, da se lahko pojavijo navzkrižne reakcije med protitelesi proti antigenom prehranskih pršic in antigeni pršic drugih vrst (Swinnen in Vroom, 2004; Jackson in sod., 2005). Najpogostejši predstavniki prehranskih pršic v prehrani psov so *Acarus siro*, *Tyrophagus putrescentiae* in *Lepidoglyphus destructor*. Redkeje se srečujemo z vrstami iz rodov *Blomia*, *Aleuroglyphus*, *Glycyphagus* in *Suidasia*. Pri testiranju velikokrat dobimo navzkrižne reakcije med protitelesi proti antigenom prehranskih pršic in antigeni hišnih pršic. Psi so pogosto senzibilizirani za antigene večih

predstavnikov pršic. Ni popolnoma jasno, ali gre za posebno bolezen ali samo varianto atopijskega dermatitisa. Klinično se bolezni ne ločita in navzkrižna reaktivnost med protitelesi proti antigenom obeh skupin pršic je pogost pojav (Kotnik, 2016b).

Diagnozo postavimo s pomočjo anamneze, kliničnega pregleda, izključevanja drugih možnih bolezni in intradermalnega ali serološkega testiranja. Najučinkovitejše in najbolj smiselno je zdravljenje z izogibanjem alergenu, kadar je to mogoče. V eni od raziskav so dokazali, da so bili pasji briketi s prehranskimi pršicami okuženi že v proizvodni liniji in so bile te v embalaži že pred odprtjem. Izognemo se jim tako, da živali ne hranimo s hrano, v kateri se prehranske pršice rade nahajajo (briketi, skladiščene žitarice). Dehidrirana hrana poleg tega močno vpija vlago, kar pospešuje rast plesni, ki olajšuje naselitev in preživetje prehranskih pršic, saj se le-te z njo hranijo. Nasprotno pa pršice hitro poginejo v pogojih brez vlage (v 5 dneh) (Kotnik, 2016c; Hennevelde in sod., 2006; Thind, 2005).

Suha pasja hrana je torej lahko primeren substrat za razmnoževanje prehranskih pršic, prisotnost oz. odsotnost in stopnja kontaminacije pa so odvisni od pogojev v okolju in pogojev skladiščenja in shranjevanja (Brazis in sod., 2008). Pomemben dejavnik je tudi toplotna obdelava, ugotovili so namreč, da toplotna obdelava spremeni topnost beljakovin, vendar se njihova alergenost ne spremeni (Broekman in sod., 2015).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Zbiranje in priprava serumov psov

V raziskavo smo vključili 31 psov različnih starosti in pasem. Vsi psi so pacienti Klinike za male živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ob obisku smo najprej anketirali lastnike, nato pa vse pse klinično pregledali po istem protokolu. Na osnovi izpolnjene ankete in kliničnega pregleda smo pse razdelili v poskusno ali kontrolno skupino. V poskusni skupini so bili psi s kliničnimi znaki alergij, v kontrolni skupini pa klinično zdravi psi brez znakov alergij.

Psom iz obeh skupin smo odvzeli 10 mL krvi iz *vene jugularis* ali *vene cephalice antebrachii*.

Kri smo takoj po odvzemu razdelili v serumske epruvete VACUETTE 3,5 mL Z Serum Sep Clot Activator (Greiner bio-one) in jih pustili stati na sobni temperaturi 30 minut, nato pa centrifugirali 10 minut pri sobni temperaturi na $1300 \times g$ (centrifuga Sigma 2K15C, Sigma Laboratory Centrifuges).

0,6 mL seruma smo shranili v alikvotih po 50 μL ($6 \times$) in 150 μL ($2 \times$), pri -20°C do analize.

Vse serume smo poslali v laboratorij Alergovet S.L. (Luis Cabrera 92, 28002 Madrid, Španija), kjer so ugotavljali IgE proti prehranskim pršicam.

Na osnovi dobljenih rezultatov smo pse znotraj obeh skupin razdelili tudi glede na IgE v serumu proti prehranskim pršicam *T. putrescentiae* in *A. siro*.

3.1.2 Priprava moke iz ličink mokařjev

Ličinke mokařjev smo skupaj s substratom (ovseni kosmiči) kupili v trgovini za hišne živali. S pinceto smo jih pobrali iz substrata in zamrznili do uporabe pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odmrznili smo jih na sobni temperaturi in 30 sekund toplotno obdelali v vreli vodi. Odcedili smo jih na cedilu in sušili v sušilniku (Memmert, UFE 500) pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ čez noč. Posušene ličinke mokařjev smo zdrobili v terilnici in zmleli v mlinčku (Bosch, MKM 600). Del zmletih mokařjev smo uporabili za Weendsko analizo, s katero smo določili osnovne skupine hranilnih snovi (surove beljakovine, surove maščobe, surov pepel, surovo vlaknino in vlago). Drugi del zmletih mokařjev pa smo pripravili za ekstrakcijo beljakovin in sicer tako, da smo jim odstranili maščobo. V razmerju 1:1 smo na moko dolili petroleter (p.a., Merck, kat. št. 101775) in pustili stati čez noč. Naslednji dan smo petroleter skupaj z maščobo odlili, moko pa sušili v sušilniku (Memmert, UFE 500) pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ še 2 uri.

3.2 METODE

3.2.1 Vprašalnik za lastnike

Vsakega lastnika psa, ki je sodeloval pri raziskavi, smo pred pregledom prosili, da izpolni in podpiše vprašalnik (Priloga 1). Lastniki so se strinjali z odvzemom krvi in uporabo serumov v raziskavi. Na podlagi odgovorov iz vprašalnika in kliničnega pregleda smo pse razvrstili v pozitivne in negativne glede na klinične znake alergijske bolezni. Psi, ki niso imeli kliničnih znakov alergijske bolezni, njihov lastnik pa je na vsa vprašanja odgovoril z »ne«, so bili vključeni v negativno skupino. V primeru, da je lastnik na vsaj eno vprašanje odgovoril z »da« ali pa je pes kazal znake alergijske bolezni, smo ga vključili v pozitivno skupino.

3.2.2 Klinični pregled psov

Klinični pregled psov smo opravili po dermatološkem protokolu Klinike za male živali, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani (Priloga 2). Vsakega psa smo natančno pregledali za znake alergijske bolezni, kot so eritem na različnih delih telesa (ušesa, šape, ingvinalno

področje), prisotnost pruritusa in lizanja. Po kliničnem pregledu smo nadaljevali z odvzemom krvi.

3.2.3 Ekstrakcija beljakovin iz ličink mokařev

Beljakovine iz moke ličink mokařev smo ekstrahirali po postopku s kislo in bazično ekstrakcijo z metodami, prirejenimi po članku Cabanillas in sod. (2014) in Zhao in sod. (2016).

3.2.3.1 Kisla ekstrakcija s HCl

1. Zatehtali smo 1 g moke ličink mokařev, dodali 25 mL 2 × destilirane vode in premešali.
2. S 6,0 M HCl smo pH uravnali na 2,0 (pH meter MA 5735, Iskra).
3. Vzorec smo homogenizirali (Ultra-turrax T25 Ika Werke) na ledu, 5 × po 30 sekund pri 14000 obr/min.
4. Po homogenizaciji smo pH z dodatkom 6,0 M HCl ponovno uravnali na 2,0 (pH meter MA 5735, Iskra).
5. Vzorec smo inkubirali 1 uro v vodni kopeli (Memmert WB 14, Memmert) pri 40 °C in ga vsakih 5 minut premešali (Vibromix 10, Tehnica).
6. Vzorec smo ohladili na sobno temperaturo.
7. Vzorec smo centrifugirali 30 minut pri 7150 × g in 22 °C (UNIVERSAL 32R, Hettich).
8. Supernatant smo odlili v 50-mililitrsko erlenmajerico, z oborino pa ponovili ekstrakcijo (točke 1 do 8).
9. Supernatante smo združili, oborine pa zavrgli. Združen vzorec supernatantov smo ponovno centrifugirali (UNIVERSAL 32R, Hettich) 30 minut, pri 7150 × g in 22 °C.
10. Supernatant smo koncentrirali v 15-mililitrskih koncentradorjih (Ultracel YM – 3, Centriprep) pri 2117 × g in 22 °C (ROTIXA/RP, Hettich) in tako pridobili koncentrirani ekstrakt. Filtrat smo zavrgli.
11. Točke 1 do 9 smo izvedli dvakrat in ekstrakta beljakovin združili.
12. Ekstraktu smo določili koncentracijo beljakovin.
13. Ekstrakt smo zamrznili v alikvotih po 250 µL pri –20 °C .

3.2.3.2 Bazična ekstrakcija z NaOH

1. Zatehtali smo 1 g moke, dodali 25 mL $2 \times$ destilirane vode in premešali.
2. Z 4,0 M NaOH smo pH uravnali na 10,0 (pH meter MA 5735, Iskra).
3. Vzorec smo homogenizirali (Ultra-turrax T25 Ika Werke) na ledu, $5 \times$ po 30 sekund pri 14000 obr/min.
4. Po homogenizaciji smo pH z dodatkom 4,0 M NaOH ponovno uravnali na 10,0 (pH meter MA 5735, Iskra).
5. Vzorec smo inkubirali 1 uro v vodni kopeli (Memmert WB 14, Memmert) pri 40 °C in ga vsakih 5 minut premešali (Vibromix 10, Tehnica).
6. Vzorec smo ohladili na sobno temperaturo.
7. Vzorec smo centrifugirali 30 minut pri $7150 \times g$ in 22 °C (UNIVERSAL 32R, Hettich).
8. Supernatant smo odlili v 50-mililitrsko erlenmajerico, z oborino pa ponovili ekstrakcijo (točke 1 do 8).
9. Supernatante smo združili, oborine pa zavrgli. Združen vzorec supernatantov smo ponovno centrifugirali (UNIVERSAL 32R, Hettich) 30 minut, pri $7150 \times g$ in 22 °C.
10. Supernatant smo koncentrirali v 15-mililitrskih koncentradorjih (Ultracel YM – 3, Centriprep) pri $2117 \times g$ in 22 °C (ROTIXA/RP, Hettich) in tako pridobili koncentrirani ekstrakt. Filtrat smo zavrgli.
11. Točke 1 do 9 smo izvedli dvakrat in ekstrakta beljakovin združili.
12. Ekstraktu smo določili koncentracijo beljakovin.
13. Ekstrakt smo zamrznili v alikvotih po 250 μ L pri –20 °C .

3.2.4 Določanje koncentracije beljakovin iz mokažev z Bio-Rad-ovim reagentom

Koncentracijo beljakovin v beljakovinskih ekstraktih mokažev smo določali z metodo po Bradfordu. Uporabili smo komercialni test za določanje koncentracije beljakovin (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad).

3.2.4.1 Uporabljene raztopine

1. Standard: Goveji serumski albumin (Bio-Rad).
2. 0,01 M PBS pufer pH 7,2:
 - 1,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
 - 0,39 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
 - 8,77 g NaCl,
 - 2 × destilirana H_2O do 1000 mL.
3. Protein Assay reagent (Bio-Rad).

3.2.4.2 Priprava vzorcev in reagenta

1. Vzorec beljakovin: 0,1 mL kislega oziroma bazičnega ekstrakta, redčenega 1:20 s PBS pufrom.
2. Standardne raztopine: 0,1 mL govejega serumskega albumina (Bio-Rad) koncentracije od 0,2 do 1,2 mg/mL z razmakom 0,1 mg/mL.
3. Slepí vzorec: 0,1 mL PBS pufra.
4. Barvni reagent: Protein Assay reagent (Bio-Rad) redčen z 2 × destilirano vodo v razmerju 1:5 (v:v).

3.2.4.3 Postopek določanja koncentracije beljakovin

1. Vzorcem, standardnim raztopinam in slepemu vzorcu smo dodali 5 mL pripravljenega barvnega reagenta in premešali (Vibromix 10, Tehtnica).
2. Po 10 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo izmerili absorbanco raztopin pri valovni dolžini 595 nm (spektrofotometer Lambda 25, PerkinElmer) v plastičnih kivetah.
3. Koncentracijo beljakovin v vzorcih smo določili na osnovi umeritvene krivulje s standardnimi raztopinami.

3.2.5 Razgradnja beljakovin s prebavnimi encimi

Izolirane beljakovine mokaarjev, ki smo jih pridobili po postopku kisle in bazične ekstrakcije, smo razgrajevali s pepsinom, tripsinom in kimotripsinom, da bi ugotovili njihovo razgradljivost s prebavnimi encimi,

3.2.5.1 Uporabljene raztopine

1. Pufer 100 mM Tris-HCl pH 2:
 - 1,21 g tris-(hidroksimetil)-aminometana (Tris) (Merck),
 - 100 mL 2 × destilirana H₂O,
 - 6 M HCl za uravnavanje pH do 2.
2. Pufer 50 mM Tris-HCl pH 2:
 - 0,605 g TRIS (Merck),
 - 100 mL 2 × destilirana H₂O,
 - 6 M HCl za uravnavanje pH do 2.
3. Pufer 50 mM Tris-HCl pH 8,3:
 - 0,605 g TRIS (Merck),
 - 100 mL 2 × destilirana H₂O,
 - 6 M HCl za uravnavanje pH do 8,3.
4. Raztopina pepsina:
 - 9,0 mg pepsina (Sigma),
 - 20 mL pufra 50 mM Tris-HCl pH 2.
5. Raztopina tripsina:
 - 8,3 mg tripsina (Sigma),
 - 20 mL pufra 50 mM Tris-HCl pH 8,3.
6. Raztopina α -kimotripsina:
 - 8,36 mg α -kimotripsina (Sigma),
 - 20 mL pufra 50 mM Tris-HCl pH 8,3.

3.2.5.2 Postopek razgradnje beljakovin s prebavnimi encimi

1. Vzorce kisle in bazične ekstrakcije beljakovin mokarjev smo razredčili s 100 mM Tris-HCl do koncentracije beljakovin 5 mg/mL.
2. S 6 M HCl smo uravnali pH na 2 (pH meter MA 5735, Iskra).
3. 5 ml vzorca ekstrakcije beljakovin s koncentracijo 5 mg/mL smo dodali 25 μ L raztopine pepsina in premešali (Vibromix 10, Tehnica) ter inkubirali v vodni kopeli (Memmert WB 14, Memmert) 60 min pri 37 °C.
4. Ob začetku razgradnje in po 60 minutah smo odvzeli vzorce za elektroforezo.
5. Pepsin smo nato inaktivirali z dodatkom 4 M NaOH do doseženega pH 8,3.
6. Dodali smo 25 μ L raztopine tripsina (Sigma) in 25 μ L raztopine α -kimotripsina (Sigma), premešali (Vibromix 10, Tehnica) in inkubirali v vodni kopeli (Memmert WB 14, Memmert) pri 37 °C 18 ur.
7. Za elektroforezo smo odvzeli vzorce po 1, 30, 60, 120 min in po 18 h razgradnje s prebavnimi encimi.

3.2.6 Diskontinuirana poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (NaDS-PAGE)

Z metodo diskontinuirane poliakrilamidne gelske elektroforeze z natrijevim dodecil sulfatom (NaDS-PAGE) smo določili molske mase beljakovin v reduciranih in nereduciranih kisljih in bazičnih ekstraktih beljakovin ter reduciranih in nereduciranih produktih pepsinske, tripsinske in α -kimotripsinske razgradnje. Redukcijo smo izvedli, da bi prekinili morebitne disulfidne vezi med polipeptidnimi verigami posameznih beljakovin. Metodo smo izvedli po Laemmliju v vertikalnem elektroforeznem aparatu Miniprotean (Bio-Rad).

3.2.6.1 Uporabljene raztopine

1. 1,5 M Tris-HCl pH 8,8:
 - 13,63 g TRIS-a (Merck),
 - do 75 mL 2 $\times$ destilirane H₂O,
 - 6 M HCl za uravnavo pH na 8,8.

Pufer smo hranili pri 4 °C do uporabe.

2. 10 % NaDS:

- 1,0 g NaDS (Bio-Rad),
- do 10 mL $2 \times$ destilirane H_2O .

Raztopino smo hranili pri 25 °C do uporabe.

3. 10 % amonijev persulfat:

- 0,020 g amonijevega persulfata (Bio-Rad),
- 180 μ L $2 \times$ destilirane H_2O .

Raztopino smo hranili pri 4 °C in jo uporabljali svežo za vsako analizo.

4. 0,5 M Tris-HCl pH 6,8:

- 3,03 g TRIS-a (Merc),
- do 50 mL $2 \times$ destilirane H_2O ,
- 6 M HCl za uravnavo pH na pH 6,8.

Pufer smo hranili pri 4 °C do uporabe.

5. Reducirni Laemli pufer:

- 5,20 mL $2 \times$ destilirane H_2O ,
- 1,80 mL 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8,
- 2,52 mL glicerol,
- 0,40 g SDS,
- 1 mL β -mercaptoetanol,
- 0,004 g bromfenol modro.

Pufer smo shranili v alikvotih po 0,7 mL pri –20 °C do uporabe.

6. Nereducirni Laemli pufer:

- 6,20 mL $2 \times$ destilirane H_2O ,
- 1,80 mL 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8,
- 2,52 mL glicerol,
- 0,40 g SDS,
- 0,004 g bromfenol modro.

Pufer smo shranili v alikvotih po 0,7 mL pri –20 °C do uporabe.

7. Koncentrirani elektrodni pufer:

- 9,0 g TRIS-a,
- 43,2 g glicina,
- 3,0 g SDS,
- 2 × destilirana H₂O do 600 mL.

Elektrodni pufer smo pripravili tako, da smo tik pred uporabo 90 mL koncentrirnega elektrodnega pufra dodali 360 mL 2 × destilirane H₂O.

8. Raztopina za barvanje gelov:

- 100 mL metanola,
- 25 mL očetne kisline,
- 125 ml 2 × destilirane vode,
- 250 mg barvila Coomassie Brilliant blue R-250 (BioRad).

9. Raztopina za razbarvanje gela:

- 400 mL metanola,
- 100 mL očetne kisline,
- 500 mL 2 × destilirane vode.

3.2.6.2 Izbira beljakovinskega standarda

Za standard, ki smo ga uporabili za določanje molskih mas beljakovin na gelih, smo uporabili Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo scientific), z mešanico obarvanih beljakovin z molekulskimi masami od 10 do 170 kDa.

3.2.6.3 Priprava vzorcev beljakovinskih ekstraktov za nanos na gel

1. Vzorce kislih in bazičnih ekstraktov mokaerjev smo redčili z 2 × destilirano vodo do koncentracije 5 mg/mL; produktov encimske razgradnje nismo redčili.
2. Nato smo pripravljene vzorce redčili v razmerju 1:2 z reducirnim ali nereducirnim Laemli-jevim pufrom.
3. Vzorce, ki smo jim dodali reducirni Laemli pufer smo inkubirali 5 minut na 95 °C.

3.2.6.4 Priprava separacijskega poliakrilamidnega gela

Pripravili smo ločitveni gel z 12-odstotno zamreženostjo, v katerem so se v nadaljnjem postopku elektroforeze beljakovine ločili po molski masi:

1. V erlenmajerico smo odpipetirali:
 - 4,35 mL 2 × destilirane vode,
 - 2,50 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8,
 - 100 µL 10 % NaDS,
 - 3,00 mL 40 % akrilamida (Bio-Rad).
2. Mešanico smo 5 min degazirali v ultrazvočni kopeli (Iskra).
3. Dodali smo 50 µL 10 % amonijevega persulfata (Bio-Rad) in 5 µL TEMED (Bio-Rad).
4. Raztopino smo vlili med stekleni plošči in ga nadplastili z 2 × destilirano H₂O.
5. Polimerizacija je potekala 45 minut na sobni temperaturi.
6. Po končani polimerizaciji smo odlili 2 × destilirano vodo.

3.2.6.5 Priprava koncentracijskega poliakrilamidnega gela

Po pripravi separacijskega gela smo pripravili koncentracijski gel s 4-odstotno zamreženostjo:

1. V erlenmajerico smo odpipetirali:
 - 3,18 mL 2 × destilirane vode,
 - 1,26 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8,
 - 50 µL 10 % NaDS,
 - 0,50 mL 40 % akrilamida (Bio-Rad).
2. Mešanico smo 5 min degazirali v ultrazvočni kopeli (Iskra).
3. Dodali smo 25 µL 10 % amonijevega persulfata (Bio-Rad) in 5 µL TEMED (Bio-Rad).
4. Raztopino smo vlili med stekleni plošči nad separacijski gel. Ob vlivljanju pripravljene raztopine na ločitveni gel smo vstavili glavnik, s katerim smo naredili žepe za nanos vzorcev.
5. Gel je polimeriziral 30 minut.

3.2.6.6 Postopek elektroforeze

1. Nosilec z geli smo vstavili v elektroforezno celico in jo napolnili z elektrodnim pufrom pH 8,3.
2. Odstranili smo glavnik.
3. V žepke koncentracijskega gela smo nanесли po 5 μ L standarda in vzorcev, ki smo jih že predhodno pripravili.
4. Elektroforeza je potekala 45 minut pri konstantni napetosti 200 V.
5. Po končani elektroforezi smo odstranili koncentracijski gel.

3.2.6.7 Barvanje beljakovin na elektroforeznem gelu

Beljakovine v ločitvenem gelu smo barvali s Coomassie Brilliant blue R-250 (BioRad) barvilom, ki nespecifično obarva beljakovine. Gelov, ki smo jih uporabili za imunoblot, nismo barvali.

1. Gel smo inkubirali 20 minut na stresalniku v raztopini za barvanje.
2. Nato smo z raztopino za razbarvanje razbarvali ozadje.
3. Gele z obarvanimi beljakovinami smo vrstično preslikali.

3.2.7 Imunoblot

Pri metodi imunoblota smo po elektroforezi beljakovine mokarjev? iz gela najprej prenesli na membrano. Nato smo na membranah ugotavljali imunske komplekse, ki so nastali po vezavi protiteles iz serumov psov na beljakovine mokarjev. S specifičnimi sekundarnimi protitelesi, ki so bili vezani z encimom HRP, smo ugotavljali vezavo pasjih IgE na beljakovine mokarjev. Z uporabo substrata eminoetilkarbazola pa smo nato zaznali nastale encimsko imunske komplekse na membranah, ki so bili videni kot rdeče lise; v nadaljevanju smo jih poimenovali imunogene lise.

3.2.7.1 Prenos beljakovin iz gela na membrano

Pred prenosom beljakovin iz gela na membrano smo pripravili membrane:

1. Membrane smo aktivirali (Immun-Blot PVDF, Bio-Rad) v metanolu 15 do 20 s.
2. Membrane smo inkubirali v $2 \times$ destilirani vodi 2 min pri sobni temperaturi.
3. Membrane smo inkubirali v pufru za prenos beljakovin 5 min pri sobni temperaturi.

Po končani elektroforezi smo gele sprali z $2 \times$ destilirano vodo in nato s pufrom za prenos beljakovin.

Beljakovine mokarjev smo iz gela prenesli na membrano z elektroelucijo:

1. Na gel smo prenesli membrano in v ustreznem ogrodju vstavili v elektroforezno celico, to pa postavili v kadičko vertikalnega elektroforeznega aparata skupaj z rezervoarjem z ledom in teflonskim mešalom.
2. Kadičko elektroforeznega aparata smo do vrha napolnili s pufrom za prenos beljakovin.
3. Prenos je potekal 45 minut pri konstantni napetosti 100 V.

3.2.7.2 Uporabljene raztopine

1. Pufer za prenos beljakovin:
 - 3,03 g TRIS-a (Merck),
 - 14,4 g glicina (Merck),
 - 200 mL metanola (Merck),
 - $2 \times$ destilirana H_2O do 1000mL.

Raztopino smo hranili pri $4^\circ C$ in jo uporabljali svežo za vsako analizo.

2. Raztopina za blokiranje neblokiranih mest na membrani:
 - 0,5 g PVP (Sigma),
 - 100 mL PBS pufra.

3. Raztopina za spiranje membran (raztopina PBST):

- 0,5 g Tween₂₀ (Sigma),
- PBS pufer do 1000 mL.

4. Barvilo aminoetilkarbazol:

- Acetatni pufer pH 5:
 - i. Raztopina A:
 - 3,4 g trinatrijevega acetata,
 - 500 mL 2 × destilirane H₂O.

ii. Raztopina B:

- 1,43 mL očetne kisline,
- 500 mL 2× destilirane H₂O.

Raztopino B dodajamo raztopini A, da dobimo acetatni pufer pH.

5. Substrat aminoetilkarbazola:

- 100 mg aminoetilkarbazola (Sigma),
- 14,28 mL dimetilformamida (Merck)

6. Priprava delovne raztopine barvila aminoetilkarbazola

- 2,5 mL substrata aminoetilkarbazola,
- 47,5 mL 0,05 M acetatnega pufra pH 5,
- 25 µL H₂O₂.

3.2.7.3 Postopek imunoblota

1. Membrane smo blokirali 2 uri na stresalniku, pri sobni temperaturi v raztopini za blokiranje neblokiranja mest na membrani.
2. Membrane smo spirali 3 × 5 min z raztopino PBST.
3. Membrane smo čez noč inkubirali s serumi psov, redčenimi v razmerju 1:50 z raztopino PBST, na stresalniku pri 4 °C.

4. Membrane smo 3×5 min spirali z raztopino PBST.
5. Membrane smo inkubirali 1 h s konjugatom kozjih protiteles proti pasjim IgE protitelesom (Goat anti-Canine IgE secondary Antibody HRP, Novusbio), redčenim v razmerju 1:1500 z raztopino PBST.
6. Membrane smo spirali 3×5 min z raztopino PBST.
7. Membrane smo za barvanje prelili z delovno raztopino aminoetilkarbazola. Imunodetekcija je potekala na stresalniku pri sobni temperaturi do pojava opečnato rdečih imunogenih lis.
8. Po barvanju smo membrane 10 min spirali z $2 \times$ destilirano vodo.
9. Membrane smo sušili na zraku pri sobni temperaturi in obarvane komplekse beljakovina-protitelo vrstično preslikali.

3.2.8 Določanje hranilnih snovi v ličinkah mokařev

Vlago, surove beljakovine, surove maščobe, surov pepel in surovo vlaknino smo določili s klasičnimi metodami, opisanimi v Uredbi Komisije (ES) št. 152/2009, Priloga III.

3.2.9 Statistično vrednotenje rezultatov

Povezavo med skupinami, pozitivnimi in negativnimi glede na klinični status, prisotnost protiteles ter pojavnost imunogenih lis v imunoblotih smo ovrednotili s Fisherjevim exact testom s program Fisher Exact Test Calculator.

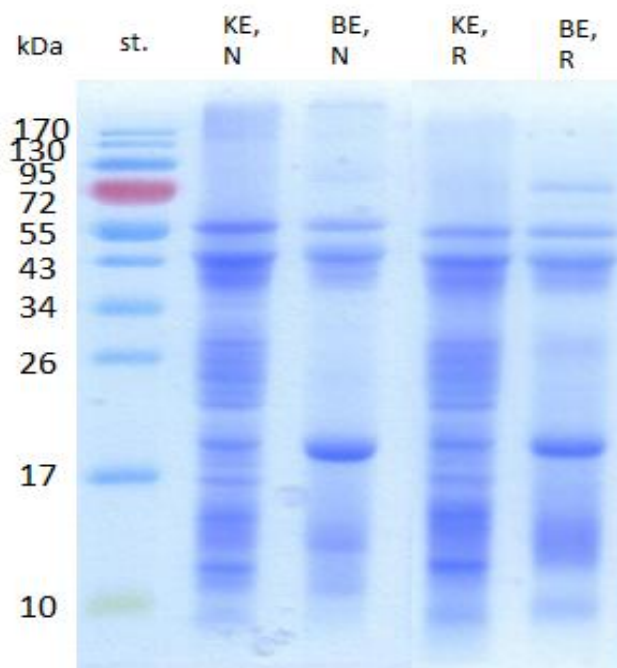
4 REZULTATI

4.1 REZULTATI EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN MOKARJEV

Koncentracija beljakovin v ekstraktu po postopku v kislem mediju je bila 14,2 mg/mL, v ekstraktu po postopku v bazičnem mediju pa 10,2 mg/mL.

4.2 ELEKTROFORETSKI PROFIL BELJAKOVIN MOKARJEV

Več beljakovin smo dobili z ekstrakcijo v kislem mediju kot po ekstrakciji v bazičnem mediju. Razlike med nereduciranimi in reduciranimi vzorci so bile nezaznavne (Slika 4).

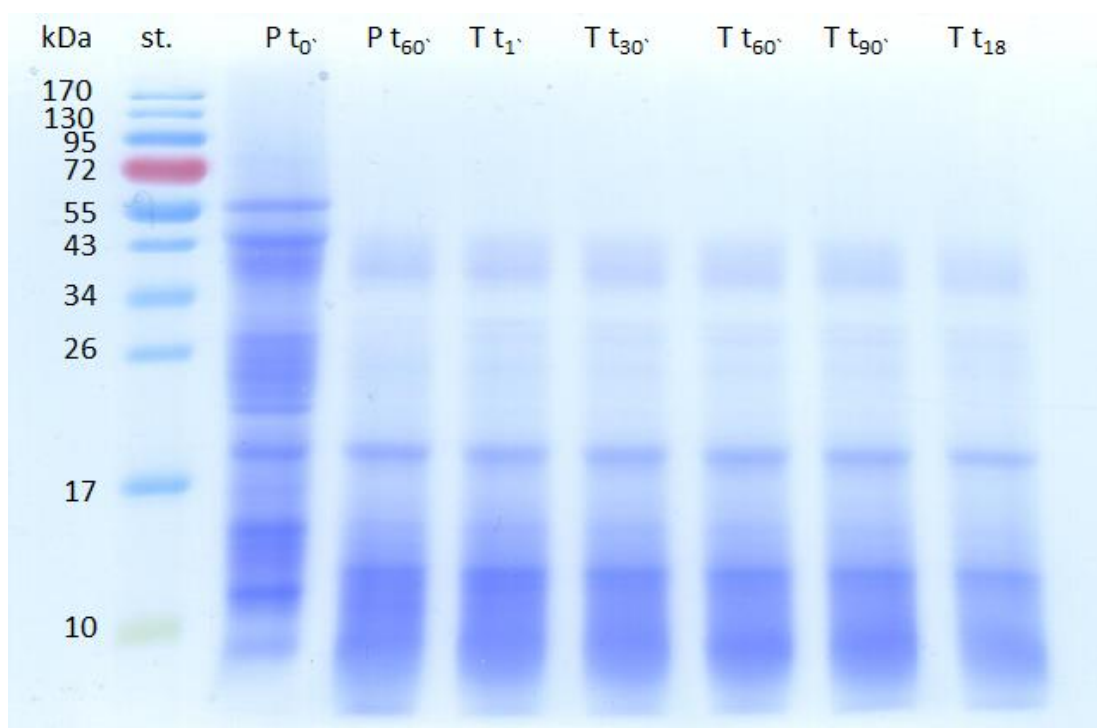


Slika 4: NaDS-PAGE beljakovin mokarjev. st.: standard; KE,N: nereducirane beljakovine kisle ekstrakcije beljakovin iz mokarjev; BE,N: nereducirane beljakovine bazične ekstrakcije beljakovin iz mokarjev; KE,R: reducirane beljakovine kisle ekstrakcije beljakovin iz mokarjev; BE,R: reducirane beljakovine bazične ekstrakcije beljakovin iz mokarjev.

Figure 4: NaDS-PAGE of mealworm proteins. st.: standard; KE,N: non-reduced mealworm proteins of acid extration; BE,N: non-reduced mealworm proteins of basic extration; KE,R: reduced mealworm proteins of acid extration; BE,R: reduced mealworm proteins of basic extration.

4.2.1 Elektroforetski profil beljakovin mokaarjev po razgradnji s pepsinom, tripsinom in α -kimotripsinom

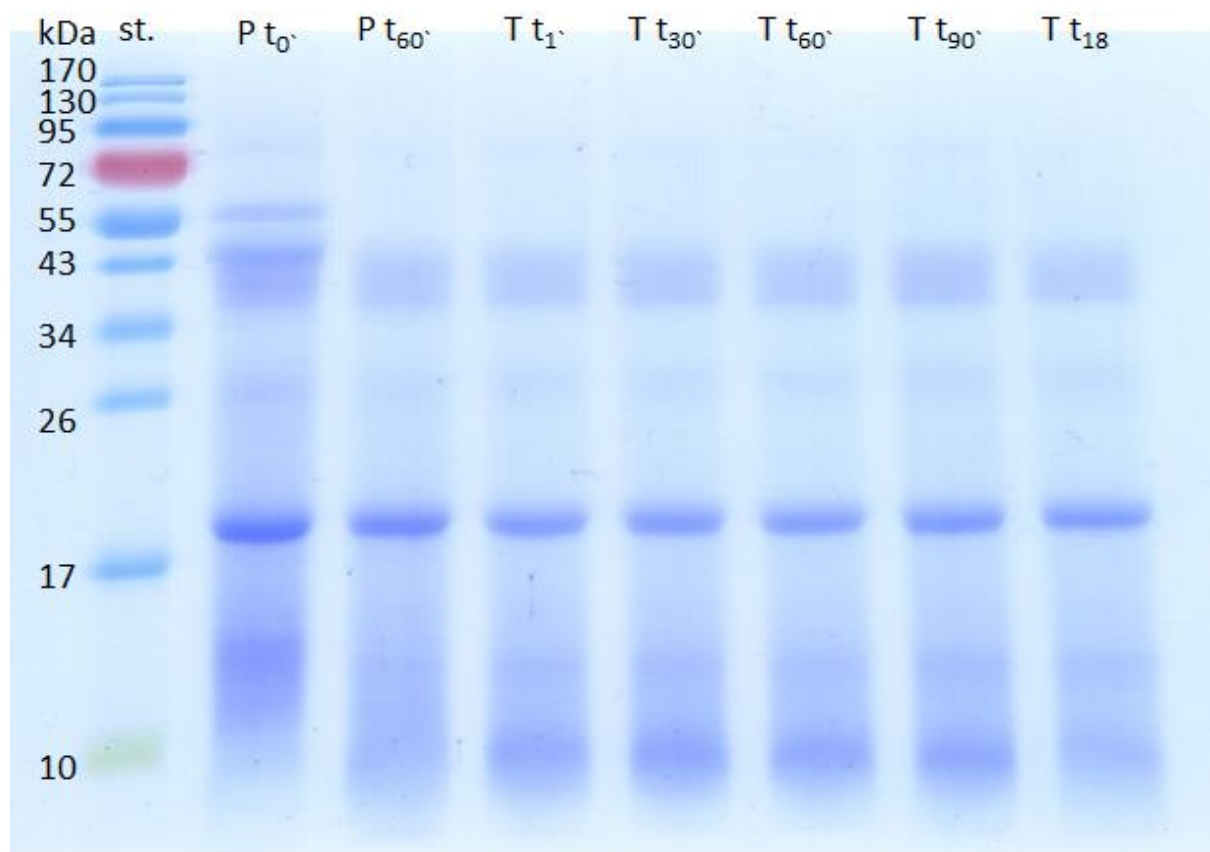
Pri razgradnji ekstrahiranih beljakovin v kislem mediju s pepsinom, tripsinom in α -kimotripsinom, so se le-ti le delno razgradili. Po 60 minutah razgradnje s pepsinom so se molekule, večje od 43 kDa, razgradile, nadaljnja razgradnja s tripsinom in α -kimotripsinom pa ni pokazala sprememb v razgrajenosti beljakovin (Slika 5).



Slika 5: NaDS-PAGE beljakovin mokaarjev, izoliranih s kislo ekstrakcijo, po encimski razgradnji s prebavnimi encimi. st.: standard; **P t₀:** alikvot, odvzet pred encimsko razgradnjo; **P t₆₀:** alikvot, odvzet po 60 min razgradnje s pepsinom; **T:** alikvot, odvzet po razgradnji s tripsinom in α -kimotripsinom (**T t₁:** po 1 min; **T t₃₀:** po 30 min; **T t₆₀:** po 60 min; **T t₉₀:** po 90 min; **T t₁₈:** po 18 urah).

Figure 5: NaDS-PAGE mealworm proteins isolated according to acid extraction, after enzymatic digestion with digestive enzymes. st.: standard; **P t₀:** aliquote taken before pepsine digestion; **P t₆₀:** aliquote taken after 60 min of pepsine digestion; **T:** aliquote taken after trypsin and α -chymotrypsin digestion (**T t₁:** after 1 min; **T t₃₀:** after 30 min; **T t₆₀:** after 60 min; **T t₉₀:** after 90 min; **T t₁₈:** after 18 hours).

Pri razgradnji ekstrahiranih beljakovin v bazičnem mediju s pepsinom, tripsinom in α -kimotripsinom, so se le-ti slabo razgradili. Po 60 minutah razgradnje s pepsinom so se molekule večje od 43 kDa razgradile, nadaljnja razgradnja s tripsinom in α -kimotripsinom pa ni pokazala sprememb v razgrajenosti beljakovin (Slika 6).



Slika 6: NaDS-PAGE beljakovin molarjev, izoliranih z bazično ekstrakcijo, po encimski razgradnji s prebavnimi encimi. st.: standard; **P t₀**: alikvot, odvzet pred encimsko razgradnjo; **P t₆₀**: alikvot, odvzet po 60 min razgradnje s pepsinom; **T:** alikvot, odvzet po razgradnji s tripsinom in α -kimotripsinom (**T t₁**: po 1 min; **T t₃₀**: po 30 min; **T t₆₀**: po 60 min; **T t₉₀**: po 90 min; **T t₁₈**: po 18 urah).

Figure 6: NaDS-PAGE mealworm proteins isolated according to basic extraction, after enzymatic digestion with digestive enzymes. st.: standard; **P t₀**: aliquote taken before pepsine digestion; **P t₆₀**: aliquote taken after 60 min of pepsine digestion; **T:** aliquote taken after trypsin and α -chymotrypsin digestion (**T t₁**: after 1 min; **T t₃₀**: after 30 min; **T t₆₀**: after 60 min; **T t₉₀**: after 90 min; **T t₁₈**: after 18 hours).

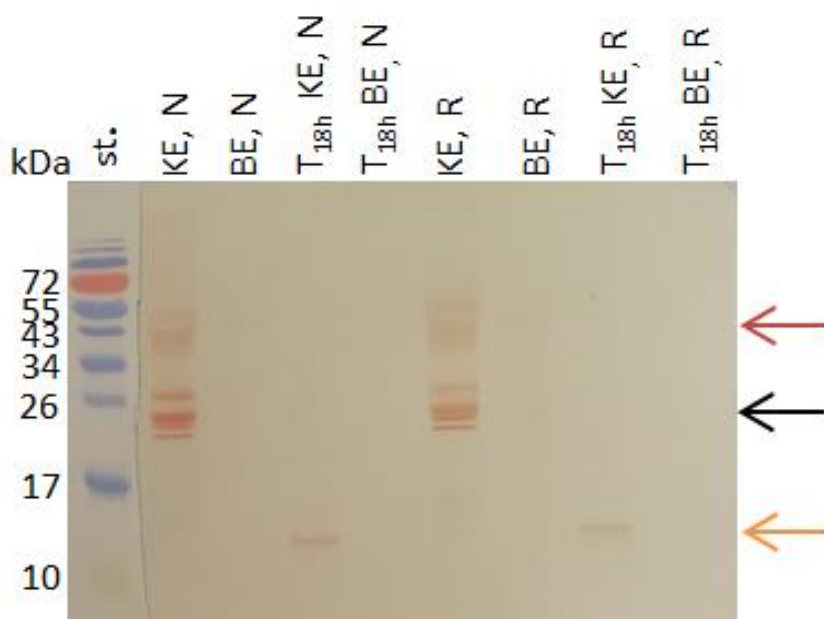
4.3 IMUNOBLOTI

IgE iz vseh serumov psov so se vezala z beljakovinami mokarjev z molekulsko maso med 20 in 30 kDa pri ekstraktih beljakovin mokarjev v kislem mediju, tako pri nereduciranih, kot reduciranih vzorcih, kar na Sliki 7 označuje črna puščica.

Razlike med serumi psov se pojavljajo v vezavi IgE z beljakovinami kisle ekstrakcije v območjih med 34 in 55 kDa, kar na Sliki 7 označuje rdeča puščica.

Pri vseh serumih psov ni zaznavnejših imunogenih lis pri beljakovinah bazične ekstrakcije.

Pri nekaterih serumih psov so se pojavile imunogene lise pri nereduciranih in reduciranih produktih pepsinske, tripsinske in α -kimotripsinske razgradnje beljakovin mokarjev kisle ekstrakcije v območju 14 kDa, kar na Sliki 7 označuje oranžna puščica.



Slika 7: Reprezentativen imunoblot. st.: standard; KE: beljakovine kisle ekstrakcije; BE: beljakovine bazične ekstrakcije; N: nereducirane beljakovine; R: reducirane beljakovine; T_{18h}: 18 urna inkubacija s prebavnimi encimi.

Figure 7: Representative immunoblot. st.: standard; KE: proteins of acid extration; BE: proteins of base extration; N: non-reduced proteins; R: reduced proteins; T_{18h}: 18 h incubation with digestion enzymes.

4.3.1 Prisotnost imunogenih lis glede na klinični status psov in prisotnost protiteles razreda E (IgE) proti prehranskim pršicam

Vse imunogene lise smo ugotovili pri imunoblotih, v katerih smo kot antigen uporabili beljakovine mokaarjev, ki smo jih izolirali po postopku kisle ekstrakcije.

Imunogene lise v območju 34 do 55 kDa se nanašajo na imunoblote, v katerih smo uporabili celoten antigen po kisli ekstrakciji, imunogena lisa pri 14 kDa pa se je pojavila pri uporabi antigena po encimski razgradnji s prebavnimi encimi, prav tako pridobljenega po postopku kisle ekstrakcije.

4.3.1.1 Prisotnost protiteles razreda E (IgE) proti prehranskim pršicam glede na klinični status živali

Pri klinično zdravih pacientih ($N = 10$) smo v 80 % odkrili IgE proti prehranskim pršicam. V skupini psov z alergijskimi simptomi (21) je bil delež psov z IgE proti prehranskim pršicam nižji in sicer 66,7 % (Tabela 5). Ugotovili smo, da prisotna IgE niso v povezavi s kliničnimi znaki alergij ($P > 0,05$).

Tabela 5: Protitelesa razreda E (IgE) v serumu psov glede na klinični status živali

Table 5: Immunoglobulins E (IgE) in dog's serum according to clinical status of the animals

SKUPINA IgE	Klinični status	
	Klinično zdravi ($N = 10$)	Alergijski simptomi ($N = 21$)
pozitivna	8	14
negativna	2	7

4.3.1.2 Prisotnost imunogenih lis glede na klinični status živali

Pri imunoblotih, v katerih smo testirali serume klinično zdravih psov, smo v 60,0 % zaznali tako imunogene lise v območju 34 - 55 kDa kot tudi imunogeno liso pri 14 kDa, ki se je pojavila v imunoblotih z antigenom mokaarjev po encimski razgradnji s prebavnimi encimi. V

imunoblotih s serumi psov, ki so kazali alergijske simptome, so se imunogene lise v območju 34 - 55 kDa pojavile v skoraj enakem deležu (61,9 %) kot pri imunoblotih s serumi zdravih psov, kar kaže na to, da zaznane imunogene lise v območju med 34 in 55 kDa niso v povezavi s kliničnimi znaki alergij ($P > 0,05$).

Imunogena lisa pri 14 kDa je bila ugotovljena v višjem deležu imunoblotov s serumi psov, ki so kazali alergijske simptome in sicer pri 80,9 %, vendar pa razlika s skupino klinično zdravih psov (pojavnost 60,0 %) ni statistično značilna ($P > 0,05$). To pomeni, da zaznana imunogena lisa pri 14 kDa, ki se je pojavila v imunoblotih z antigenom mokaarjev po encimski razgradnji s prebavnimi encimi, ni v povezavi s kliničnimi znaki alergij (Tabela 6).

Tabela 6: Deleži imunoblotov s prisotnimi imunogenimi lisami glede na klinični status živali

Table 6: Immunoblots with detectable bands (%) according to clinical status of animals

SKUPINA	Klinični status	
	Klinično zdravi (N = 10)	Alergijski simptomi (N = 21)
Imunogene lise (34 - 55 kDa)	60,0 %	61,9 %
Imunogena lisa (14 kDa) po encimski razgradnji	60,0 %	80,9 %

4.3.1.3 Prisotnost imunogenih lis glede na prisotnost protiteles razreda E (IgE) proti prehranskim pršicam

Pri obeh skupinah imunoblotov glede na prisotnost IgE proti prehranskim pršicam se imunogene lise v območju 34 do 55 kDa pojavljajo v nižjem deležu kot imunogena lisa pri 14 kDa, ki se je pojavila v imunoblotih z antigenom mokaarjev po encimski razgradnji s prebavnimi encimi (Tabela 7).

Imunogene lise v območju 34 do 55 kDa so se v skupini imunoblotov s serumi psov, pri katerih smo ugotovili tudi IgE proti prehranskim pršicam, pojavile v višjem deležu (63,6 %) kot v skupini imunoblotov s serumi psov, kjer omenjenih IgE nismo ugotovili (55,6 %),

vendar pa med prisotnostjo imunogenih lis v območju 34 do 55 kDa in prisotnostjo IgE proti prehranskim pršicam nismo ugotovili statistično značilne povezave ($P > 0,05$).

Imunogena lisa pri 14 kDa je bila ugotovljena v podobnem deležu pri obeh skupinah; v 72,7 % oziroma 77,8 % (Tabela 7), kar kaže na to, da zaznana imunogena lisa, ki se je pojavila v imunoblotih z antigenom mokaarjev po encimski razgradnji s prebavnimi encimi, ni v povezavi s prisotnostjo IgE proti prehranskim pršicam ($P > 0,05$).

Tabela 7: Deleži imunoblotov s prisotnimi imunogenimi lisami glede na protitelesa razreda E (IgE) proti prehranskim pršicam

Table 7: Immunoblots with detectable bands (%) according to immunoglobulins E (IgE) against nutrition mites

SKUPINA	IgE	
	pozitivna (N = 22)	negativna (N = 9)
Imunogene lise (34 - 55 kDa)	63,6 %	55,6 %
Imunogena lisa (14 kDa) po encimski razgradnji	72,7 %	77,8 %

4.4 HRANILNA VREDNOST LIČINK MOKARJEV

Vsebnost osnovnih hranilnih snovi v vzorcu ličink mokaarjev je predstavljena v Tabeli 8.

Tabela 8: Vsebnost hranilnih snovi v vzorcih ličink mokaarjev

Table 8: Nutrient content in mealworm larvae samples

Parameter	%
suha snov	100
surove beljakovine	52,9
surova olja in maščobe	28,5
surove vlaknine	14,4
surovi pepel	3,6

5 RAZPRAVA

V svetu potreba po hrani zaradi naraščajoče populacije ljudi in živali narašča, zato se bodo v prihodnosti potrebe po novih virih beljakovin povečevale. Povečuje se tudi zanimanje za uporabo žuželk v prehrani ljudi in živali, ki bi jih zaradi ustrezne prehranske sestave lahko uporabili namesto klasičnih virov beljakovin, kot sta meso in soja. Nove beljakovine v prehrani ljudi in živali zahtevajo ocene tveganja, ki vključujejo tudi potencialno alergienost (EFSA, 2015). Ker se je na tržišču že pojavila hrana za pse, ki kot beljakovinsko komponento vsebuje moko žuželk (<https://www.yorapetfoods.com/yora-pet-foods>; <https://www.petissimo.si/za-pse/suha-hrana/trovet/trovet-hypoallergenic-insect-dog-ipd.html>), smo v naši nalogi želeli prispevati k razjasnitvi morebitne alergienosti beljakovin žuželk v takšni hrani. Izhajali smo iz raziskav, v katerih opisujejo navzkrižno alergienost z beljakovinami žuželk pri ljudeh, ki so alergični na hišne pršice ali morske rake (Verhoeckx, 2014; Broekman, 2016), kajti pri psih takšne raziskave še niso narejene. Böhm in sod. (2018) so edini izvedli raziskavo, v kateri so pse z znaki alergij hranili s komercialno hrano, ki je vsebovala beljakovine žuželk. Na osnovi rezultatov so zaključili, da bi takšna hrana lahko bila zanimiva izbira za pse z alergijami. Dokazali so namreč statistično značilno izboljšanje poškodb na koži in kakovosti dlake, ne pa tudi srbeža. Psi so pogosto alergični na prehranske pršice, zato smo želeli ugotoviti ali psi z ugotovljenimi IgE proti prehranskim pršicam, izražajo tudi IgE proti beljakovinam žuželk.

V Evropski uniji trenutno lahko za krmo živali, namenjenih za prehrano, uporabljamo 7 različnih vrst žuželk, vendar samo za akvakulture (Gasco in sod., 2019). Psi niso živali v prehranski verigi, zato lahko za njih žuželke uporabljamo kot vir beljakovin. Ker so žuželke po hranilni vrednosti podobne mesu, način reje pa je zelo učinkovit in trajnosten, so postale zanimive tudi v prehrani psov. Nenazadnje takšno hrano iščejo lastniki, ki so proti ubijanju toplokrvnih živali za prehrano ljudi. Dejstvo je, da so rezultati *in vitro* raziskav obetavni, vendar obstajajo precejšnje razlike med posameznimi vrstami žuželk glede vsebnosti beljakovin, aminokislinske sestave in prebavljivosti. Na splošno velja, da imajo žuželke visoko vsebnost beljakovin in dobro aminokislinsko sestavo, vendar pa je prebavljivost lahko slabša kot pri piščančji, ribji in sojini moki (Bosch in sod., 2014). V vzorcih ličink mokaarjev smo ugotovili večjo vsebnost beljakovin in manjšo vrednost maščob (Tabela 8), kot je

navedena v literaturi (Tabela 2), kar potrjuje trditve, da je vsebnost hranilnih snovi v žuželah odvisna od substrata in da zelo variira.

Preobčutljivostne reakcije, ki sledijo zaužitju insektov, lahko razdelimo na dve skupini – direktna preobčutljivost na žuželke in reakcije navzkrižne reaktivnosti z alergeni drugih vrst. Primarna alergija na žuželke je bila ocenjena pri podganah, miših in budrah. Metode, s katerimi se v idealnih razmerah določa alergenost insektov namenjenih prehrani in torej tudi raznim načinom kuhanja, so kombinacija poskusov *in vitro* in *in vivo* po toplotni obdelavi žužalk (Broekman in sod., 2015). Med drugim so preverjali razlike v vezavi IgE na različno toplotno obdelane beljakovine mokaarjev (pečenje, blanširanje, kuhanje, cvrtje in sušenje z zamrzovanjem) tudi z imonokemijsko metodo imunoblota (Van Broekhoven in sod., 2016; Phiriyangkul in sod., 2015; Broekman in sod., 2015; Jeong in sod., 2016). Ker so imunoblotti odvisni od kapacitete vezave IgE in ker vemo, da spremembe v sposobnosti vezave IgE niso nujno v povezavi s kliničnimi simptomi, so še vedno nujno potrebne raziskave *in vivo* (Broekman in sod., 2015).

Najpomembnejši del diagnostike alergije na hrano je klinični pregled, zato smo temu delu posvetili veliko pozornosti. Na osnovi kliničnega pregleda smo pse (N = 31) razdelili v dve skupini: brez (N = 10) in s kliničnimi znaki alergijske bolezni (N = 21). Kliničnemu pregledu smo dodali tudi odgovore lastnikov na vprašanje o predhodnih znakih alergij. Preobčutljivost na hrano se kaže z nesezonskim pruritusom, pri katerem je terapija s steroidi lahko uspešna ali pa tudi ne. Pruritus je lahko lokalni ali generaliziran, običajno pa srbijo ušesa, tačke, ingvinalno ali aksilarno področje, obraz, vrat ali perineum. Prizadeta koža je pogosto eritematozna, lahko se razvijejo tudi papularni izpuščaji. Zaradi praskanja se sekundarno pojavijo alopecija, ekskoriacije, prhljaj, kraste, hiperpigmentacija ali lihenifikacija. Pogosti so tudi sekundarna površinska pioderma, dermatitis, povzročen z *Malassezia pachydermatis* in vnetje zunanjskega sluhovoda. Pri nekaterih psih je pruritus minimalen in se lahko preobčutljivost kaže s ponavljajočim dermatitisom ali otitisom. V teh primerih se pruritus pojavi ob pojavu sekundarnih sprememb. Občasno se pojavlja urtikarija ali angioedem. Spremljajoči gastrointestinalni znaki (mehek feces, diareja, bruhanje, flatulenca) se pojavljajo v 20 do 30 % primerov. Glavne diferencialne diagnoze vključujejo ostale preobčutljivosti (atopija, alergija na boljši pik, kontaktni dermatitis), parazitarne infestacije (garjavost,

cheyletielloza, pedikuloza), folikulitis (zaradi bakterij, dermatomikoz, demodikoze) in dermatitis, povzročen z *Malassezia* (Medleau in Hnilica, 2006).

V našo raziskavo smo vključili 31 psov, katerih serume smo testirali na prisotnost IgE proti prehranskim pršicam *T. putrescentiae* in *A. siro*. Sprva smo želeli imeti kontrolno skupino, v kateri bi bili samo klinično zdravi psi brez protiteles proti *T. putrescentiae* in *A. siro*, vendar se je izkazalo, da ima kar 8 od 10 psov, ki smo jih namenili za kontrolo, povišane vrednosti IgE, čeprav so bili klinično zdravi in niso kazali nobenih alergijskih znakov.

Serološko alergijsko testiranje sicer pogosto uporabljamo v obravnavi psov z alergijsko boleznijo, vendar je poznano, da nivo protiteles ni v povezavi s tem, ali je žival alergična ali ne. Pomembno se je zavedati omejitev te vrste testiranja. Test določa nivo protiteles v krvnem obtoku, kar ne odraža nujno tudi nivoja protiteles lokalno v ciljnem organu (koži), kjer so vezana na mastocyte in Langerhansove celice. Serološko testiranje ima torej nizko specifičnost in nizko pozitivno napovedno vrednost. Določanje nivoja protiteles v serumu je nezanesljiv pokazatelj alergijskega statusa organizma in ga torej ne uporabljamo za ločevanje alergičnih živali od zdravih. Služi lahko določanju nabora alergenov, ki jih uporabimo za zdravljenje z imunoterapijo. Čeprav laboratoriji ponujajo določanje protiteles na paleto okoljskih in prehranskih alergenov, je smiselno in relevantno upoštevati le nivo protiteles na okoljske alergene (Kotnik, 2016c). Testiranje serumov psov na prehransko-specifične IgE in IgG je slabo ponovljivo in nenatančno. Testi proliferacije limfocitov so bili pogostejše pozitivni in bolj natančni, vendar se jih v praksi težko izvaja, zato zaenkrat ostajajo orodje za znanstvene raziskave. Ocene drugih testov so bile izvedene v raziskavah z manjšim številom živali – dobre rezultate za izbiro sestavin eliminacijske diete dajejo t.i. "patch" testi (testi z obliži). Gastroskopsko in kolonoskopsko testiranje kot tudi prehransko specifični IgE v blatu ali prehransko specifični serumski IgG so manj uporabni (Mueller in Olivry, 2017). Serološko testiranje ni zanesljiva metoda, saj nivo protiteles ni v povezavi s tem, ali je žival alergična ali ne, zato smo kontrolno in poskusno skupino oblikovali na podlagi kliničnega pregleda, ki je najpomembnejši del diagnoze alergije na prehrano.

Pred odobritvijo vsakega novega živila ali krmila na trgu je potrebno preučiti tveganja za zdravje ljudi in živali, pa tudi potencialne negativne vplive na okolje. Omenili smo že, da psi, ker niso rejne živali, izpadejo iz tega sistema preverjanja, vendar je tudi za njih potrebno vedeti, da vse vrste žuželk niso varne in primerne za prehrano, pri izbiri žuželk za namene

prehrane ljudi in živali moramo upoštevati mikrobiološka, kemična, fizikalna, alergijska, parazitarna in toksikološka tveganja, ki jih vnos novega prehranskega vira predstavlja (Sun - Waterhouse in sod., 2016).

Pri ljudeh so bile opisane alergije na hrano iz ličink sviloprejk, mokařev, gosenic, *Bruchus lentis*, palmovega rilčkarja, kobilic, škržatov, čebel, večče *Clanis bilineata* in na prehranski aditiv karmin, ki se pridobiva iz samic insekta *Dactylopius coccus*. Alergija na ščurke je bila opisana samo kot posledica inhalacije (EFSA, 2015). Identificirali so številne snovi iz žuželk, ki so vzrok za preobčutljivostno reakcijo, med drugimi tudi tropomiozin in arginin kinazo. Obe molekuli sta pan-alergena, znana po navzkrižnih reakcijah s homolognimi beljakovinami pri raki in hišnih pršicah. Navzkrižne reakcije in/ali ko-senzibilizacija tropomiozina in arginin kinaze iz žuželk so bile dokazane pri ljudeh, ki so alergični na antigene hišne pršice ali morske hrane (na primer kozice). Potencial za navzkrižno reakcijo pri alergiji na užitne insekte imajo tudi številne druge vrste (predvsem antigeni neužitnih insektov kot so pajkovci, pršice, druga morska hrana, sesalci, nematodi, trematodi, rastline in glive) (EFSA, 2015).

V veterinarski medicini je prevalenca škodljivih reakcij na hrano v primerjavi s humano medicino slabo raziskana, čeprav število takšnih reakcij kot tudi raziskav narašča. Značilnosti alergijske reakcije pri ljudeh in pri psih so pogosto povzročene s podobnimi mehanizmi, ki pa so včasih med vrstama tudi različni, kar izzove različne specifične klinične znake, različne diagnostične postopke in zdravljenje. Malo je znanega o alergenih molekulah, ki povzročajo preobčutljivostno reakcijo tipa I, ki bi lahko bile pokazatelji za oceno tveganja, kot to že obstaja pri ljudeh (Kotnik, 2016a).

Zlati standard za diagnozo prehranske alergije je eliminacijska dieta, ki ji sledi provokacijska (Mueller in Olivry, 2017; Pali - Schöll in sod., 2017). Eliminacijska dieta mora trajati vsaj 8 tednov (Mueller in Olivry, 2015). Izvede se lahko z doma pripravljeno hrano ali s komercialno pripravljeno hrano, ki vsebuje beljakovine in ogljikove hidrate, ki jim pacient še ni bil izpostavljen. Izbira prave diete je lahko zahtevna zaradi več razlogov. Pogosto zgodovina prehranjevanja pacienta ni popolnoma jasna. Nadalje se lahko zgodi, da so navedbe na embalaži pomanjkljive, velik problem pa so tudi priboljški, pri katerih je vir beljakovin pogosto neznan. Proizvajalci vedno pogosteje uporabljajo vire, ki so bili do nedavnega še zelo redki (na primer noj ali kenguru), zato je včasih zelo težko poiskati nek nov vir beljakovin oziroma ogljikovih hidratov. Nenazadnje lahko pride tudi do navzkrižnega

reagirane med (včasih nepovezanimi) viri hrane, kar lahko vodi do lažno negativnih rezultatov. Velikokrat se za eliminacijsko dieto izbere hrano, ki vsebuje hidrolizirane beljakovine, vendar ni popolnoma jasno, ali je izbira le-te boljša od izbire nehidroliziranega drugega vira beljakovin (Olivry in Bizikova, 2010; Bizikova in Olivry, 2016). Poleg tega prag, ki ga mora preseči molekula, da izzove alergijsko reakcijo pri psih, ni točno določen. Za ljudi velja, da alergijske reakcije ne izzovejo peptidi, manjši od 3 kDa (Bu in sod., 2013), za pse pa velikostni razred ni točno določen (Bizikova in Olivry, 2016).

Hrana za pse, ki vsebuje beljakovine žuželk, bi lahko predstavljala novo izbiro pri eliminacijskih dietah. Proizvajalci jo opisujejo kot monoproteinsko in hipoalergeno hrano (<https://www.petissimo.si/za-pse/suha-hrana/trovet/trovet-hypoallergenic-insect-dog-ipd.html>). Slednje navedbe so vprašljive, kajti v literaturi nismo našli raziskav, ki bi to trditev potrjevale. Ljudje smo nehote izpostavljeni konzumaciji žuželk s sadjem in zelenjavo ali pasiranimi zelenjavnimi in sadnimi sokovi (van Huis, 2013). Zelo verjetno je podobno pri psih, poleg tega pa so psi izpostavljeni tudi prehranskim pršicam, na katere so pogosto alergični. Naslednje vprašanje, ki se postavlja je ali psi reagirajo podobno kot ljudje in torej obstaja možnost, da bi bili psi, ki so alergični na prehranske pršice, alergični tudi na beljakovine žuželk. V hrano za pse sta pogosto dodana hondroitin in glukozamin, ki ju pridobivajo iz lupin školjk ali rakov. Na ta način je po našem mnenju znaten delež populacije psov vsakodnevno izpostavljen alergenom žuželk.

Alergija na hrano je pogost vzrok številnih dermatoloških in gastrointestinalnih težav pri psih. Potrebno jo je razlikovati od intolerance na hrano, pri kateri imunski sistem ne sodeluje. Rizična faktorja za razvoj alergije na hrano sta poškodba sluznične bariere gastrointestinalnega trakta in pomanjkanje tolerance za antigene v hrani. Tip I, III in IV preobčutljivostnih reakcij so najverjetnejši imunološki mehanizmi. Alergijo oziroma preobčutljivostno reakcijo tipa I lahko povzročijo vse sestavine hrane, vendar so najpogostejše alergeni glikoproteini z molekulsko maso 10 - 70 kDa. Odporni so na obdelavo s toploto, kislino in proteazami. Točna prevalenca alergije na hrano pri psih ni znana, ni pasemskih, spolnih ali starostnih predispozicij, čeprav so nekatere pasme bolj pogosto obremenjene (Verlinden in sod., 2006). V našem poskusu so se beljakovine mokaarjev pri razgradnji s pepsinom, tripsinom in α -kimotripsinom *in vitro* slabo razgradile, po 60 minutah razgradnje s pepsinom so se molekule večje od 43 kDa razgradile, nadaljnja razgradnja s tripsinom in α -

kimotripsinom pa ni pokazala sprememb v razgrajenosti. Ostanek večjih beljakovinskih fragmentov je eden od pokazateljev, da so mokarji v prehrani potencialno alergeni (Verhoeckx in sod., 2019)

Ugotovljeno je bilo, da beljakovini tropomiozin in arginin kinaza iz mokarjev ohranita svojo sposobnost vezave na humana IgE tudi po toplotni obdelavi (Van Broekhoven in sod., 2016; Phiriyangkul in sod., 2015; Broekman in sod., 2015; Jeong in sod., 2016), kar pomeni, da so tudi nekatere beljakovine žuželk lahko za pse potencialno alergene. Predvidevanja je potrebno v bodoče preveriti z dodatnimi raziskavami; s proteomskimi analizami bi bilo namreč smiselno ugotoviti, katere beljakovine se pojavljajo na mestu ugotovljenih imunskih kompleksov z IgE (imunogenih lis) pri imunoblotih, ki smo jih ugotovili v naši študiji.

Imunoblot je laboratorijska imunokemijska metoda za ugotavljanje kompleksov antigen – protitelo, oziroma beljakovina – protitelo. Z imunoblotom lahko zaznamo posamezno beljakovino v zmesi mnogih beljakovin v primeru, da ima ohranjen epitop, s katerim se lahko veže s specifičnim protitelesom. Lahko zaznamo tudi navzkrižne vezave protiteles z beljakovinami podobne strukture z enakimi antigenskimi determinantami. Metodo imunoblota smo uporabili v naši raziskavi, saj je bilo glavno vprašanje ravno možnost vezave med beljakovinami mokarjev in IgE v serumih psov ter nadalje povezava s prisotnostjo IgE proti prehranskim pršicam.

Vse imunogene lise smo ugotovili pri imunoblotih, v katerih smo kot antigen uporabili beljakovine mokarjev, ki smo jih izolirali po postopku kisle ekstrakcije. Pri vseh vzorcih serumov psov smo ugotovili imunogene lise v območju 20 do 30 kDa, razlike med posameznimi serumi pa so se pojavljale v območju 34 do 55 kDa in pri 14 kDa produktu encimske razgradnje s prebavnimi encimi.

Ugotovili smo, da prisotna IgE proti prehranskim pršicam niso v povezavi s kliničnimi znaki alergij ($P > 0,05$). Med prisotnostjo imunogenih lis v območju 34 - 55 kDa in prisotnostjo IgE proti prehranskim pršicam prav tako nismo ugotovili statistično značilne povezave ($P > 0,05$). Imunogena lisa (14 kDa), ki se je pojavila v imunoblotih z antigenom mokarjev po encimski razgradnji s prebavnimi encimi, ni v povezavi s prisotnostjo IgE proti prehranskim pršicam ($P > 0,05$). Največja razlika med skupinama je bila v pojavu imunogene lise pri 14 kDa po encimski razgradnji in sicer se je lisa pojavila pri 60 % klinično zdravih psov in 80,9 % psov

z znaki alergij. Razlika ni bila statistično značilna; možno je, da gre za nespecifično vezavo protiteles hrati pa tudi, da bi pri večjem številu vzorcev potrdili statistično značilno povezavo med kliničnimi znaki in pojavnostjo imunogene lise pri 14 kDa. Zavedati se moramo tudi, da so bili psi s kliničnimi znaki alergij senzibilizirani še na vrsto drugih alergenov, ne samo na prehranske pršice, kar dodatno otežuje razlago rezultatov. Iz prakse izhajajo, da bi bilo zelo težko oblikovati skupino psov, ki bi imeli povečan nivo IgE samo proti prehranskim pršicam.

Verhoeckx in sod. (2014) so za tveganje alergij v skladu s priporočili EFSA testirali mokaarje. Pripravili so različne beljakovinske frakcije in preverjali navzkrižno reaktivnost serumov pacientov, alergičnih na rake in hišne pršice. Serume so testirali z imunoblotti, naredili so še test aktivacije bazofilcev in odpornost na razgradnjo s pepsinom. Kot alergena so ugotovili tropomiozin in arginin kinazo, ki se verjetno pojavljata tudi v naši raziskavi, vendar pa bi za potrditev naše domneve potrebovali rezultate proteomske analize.

Zadnje letošnje mnenje skupine ekspertov je (Verhoeckx in sod., 2019), da se naj bi test odpornosti razgradnje s pepsinom, ki se je do sedaj množično uporabljal v raziskavah, umaknil iz protokolov. Test namreč nikoli ni bil validiran in ne obstaja zanesljiva povezava med sposobnostjo beljakovine, da spodbudi alergijsko reakcijo in odpornostjo na razgradnjo s pepsinom. Potrebno bi bilo npr. raziskati fiziološke razlike med oralno in gastrično fazo prebave pri atopičnih in ne-atopičnih pacientih. Senzibilizirani osebki imajo lahko slabšo resorbcijo za alergene, na katere razvijejo protitelesa. Veliko različnih parametrov lahko vpliva tudi na pH v želodcu, kar ima neposreden učinek na prebavljivost beljakovin. Idealno bi bilo imeti validirane in standardizirane protokole, kjer sta pH in delovanje encimov prilagojena posamezniku, vendar smo ta trenutek še daleč od rešitve.

Na osnovi naših rezultatov ne moremo sklepati o možnosti alergične reakcije pacientov (psov), ki so alergični na prehranske pršice, na beljakovine mokaarjev, kar delno potrjuje rezultate raziskave Böhm in sod. (2018). Ugotovili so, da bi hrana z beljakovinami žuželk bila možna izbira pri alergičnih pacientih. V raziskavi smo uporabili razgradnjo beljakovin s prebavnimi encimi, ki sicer ni standardiziran postopek, kljub temu pa ga uporabljajo v večini raziskav alergenosti. Ugotovili smo, da so beljakovine mokaarjev le delno razgradljive s prebavnimi encimi, kar je eden izmed pokazateljev za potencialno alergenost beljakovin. Potrebne so še nadaljnje študije, da dobimo jasne zaključke, kaj hrana za pse z beljakovinami žuželk lahko povzroči pri senzibiliziranih živalih.

Rezultati naše študije odpirajo nova vprašanja na področju raziskav potencialne alergenosti beljakovin mokařev pri psih. S proteomsko analizo bi lahko ugotovili specifične beljakovine mokařev, ki so se vezale z IgE v serumih psov, kar do sedaj še ni bilo raziskano. S tem bi prispevali k ugotavljanju navzkrižne reaktivnosti z beljakovinami drugih alergenov, npr. s tropomiozinom in arginin kinazo, kar je že bilo potrjeno pri ljudeh.

6 SKLEPI

1. IgE proti prehranskim pršicam *T. putrescentiae* in *A. siro* smo dokazali tako v serumih psov s kliničnimi znaki alergij (66,7 %) kot tudi v serumih psov brez kliničnih znakov alergijske bolezni (v 80 %). Nasprotno s pričakovanji je bil delež psov z IgE višji v skupini klinično zdravih psov kot v skupini psov brez kliničnih znakov alergijske bolezni.
2. Beljakovine mokaarjev so se po razgradnji s prebavnimi encimi delno razgradile na produkte z nižjimi molekulskimi masami. Po 60 minutah razgradnje s pepsinom so se molekule, večje od 43 kDa, razgradile, nadaljnja razgradnja s tripsinom in α -kimotripsinom pa ni pokazala sprememb v razgrajenosti beljakovin.
3. Ugotovljene imunogene lise v imunoblotih (imunski kompleksi med beljakovinami mokaarjev in IgE iz pasjih serumov) niso v povezavi s kliničnimi znaki alergijskih bolezni in tudi ne z IgE proti prehranskim pršicam.

7 POVZETEK

Na svetu trenutno živi 7,4 milijard prebivalcev, po napovedih strokovnjakov pa bo število do leta 2050 povečalo na 9,6 milijard (Meze, 2014). S povečevanjem svetovnega prebivalstva se povečuje tudi potreba po hrani, zato potrebujemo nove vire in nove načine pridelave hrane. V ta namen že preiskujejo alternativne vire beljakovin kot so žuželke. Žuželke že dolgo poznamo v prehrani ljubiteljskih živali, v zadnjem času pa se pojavljajo tudi v prehrani psov, predvsem kot nov vir beljakovin za pse, ki so pogosto preobčutljivi na beljakovine mesa v njihovi prehrani (piščanec in govedina). Preobčutljivost na hrano je pri psih in mačkah tretja najpogostejša alergijska bolezen in pomeni pri teh vrstah 5 % vseh dermatoz. Substance, ki povzročajo alergije so tropomiozini, arginin kinaza, hitin in druge, ki se pojavljajo pri nižje razvitih organizmih (raki, školjke, žuželke, pršice). Pri ljudeh so že opravljene raziskave glede alergenosti žuželk, prav tako je dokazana navzkrižna reaktivnost med protitelesi proti antigenom morskih sadežev, predvsem rakov in antigeni žuželk. Pri psih takšne raziskave še niso opravljene, zato je bil namen našega dela prispevati k področju raziskav ugotavljanja potencialne alergenosti beljakovin mokaarjev (*Tenebrio molitor*).

S kemijskimi analizami smo v vzorcih ličink mokaarjev (*Tenebrio molitor*) določili hranilno vrednost. Beljakovine ličink mokaarjev smo ekstrahirali v kislem in bazičnem mediju, določili njihovo koncentracijo in elektroforezni profil. Nato smo jih razgradili s prebavnimi encimi in dobljene fragmente primerjali med seboj na podlagi elektroforeznega profila. V raziskavo je bilo vključenih 31 psov različnih starosti in pasem, ki so bili na osnovi kliničnega pregleda razdeljeni v dve skupini. V kontrolni skupini so bili psi brez znakov alergijske bolezni (N=10), v poskusni pa psi s kliničnimi znaki alergijske bolezni (N = 21). V serumih vseh psov smo določali protitelesa proti prehranskim pršicam *T. putrescentiae* in *A. siro*. Nadalje smo z imunokemijsko metodo imunoblot testirali serume psov. Ugotavljali smo specifične vezave IgE na antigene mokaarjev.

Koncentracija beljakovin v ekstraktu po postopku v kislem mediju je bila 14,2 mg/mL, v ekstraktu po postopku v bazičnem mediju pa 10,2 mg/mL. Pri razgradnji ekstrahiranih beljakovin s prebavnimi encimi, so se le-ti slabo razgradili. Po 60 minutah razgradnje s pepsinom so se molekule večje od 43 kDa razgradile, nadaljnja razgradnja s tripsinom in α -kimotripsinom pa ni pokazala sprememb v razgrajenosti beljakovin. Pri imunoblotu vseh

vzorcev so se IgE vezala z beljakovinami med 20 in 30 kDa. Razlike med serumi psov so se pojavljale v vezavi IgE z beljakovinami v območju med 34 in 55 kDa ter beljakovino z molsko maso 14 kDa, dobljeno po razgradnji s prebavnimi encimi. Razlike med testnimi skupinami pa niso potrdile statistično značilne povezave med prisotnostjo imunogenih lis, kliničnimi znaki alergij in prisotnostjo IgE proti prehranskim pršicam ($P > 0,05$).

Na podlagi ugotovitev ne moremo sklepati o možnostih navzkrižne alergenosti med antigeni beljakovin mokaarjev in protitelesi proti prehranskim pršicam. Z vključitvijo proteomske analize potencialnih alergenov pa bi v bodoče lahko prispevali k odgovoru na vprašanje o možnosti navzkrižne reaktivnosti. Ugotovili pa smo, da so beljakovine mokaarjev slabo razgradljive s prebavnimi encimi, zato so potencialni alergeni. Potrebne so še dodatne raziskave na večjem številu živali.

8 ZAHVALA

Zahvaljujeva se izr. prof. dr. Bredi Jakovac Strajn za mentorstvo, nesebično pomoč, potrpežljivost, prijaznost, podporo in številne nasvete pri izvedbi dela ter pisanju naloge. Hvala za vse ure, ki ste nama jih naklonili.

Hvala somentorici prof. dr. Petri Zrimšek za pomoč pri laboratorijskem delu, pisanju naloge, izvedbi statistične analize, ter za prijaznost in potrpežljivost.

Hvala prof. dr. Tini Kotnik za pomoč pri kliničnem delu, pri zbiranju literature in za nasvete.

Hvala asist. dr. Blanki Premrov Bajuk in Katarini Babnik za pomoč pri delu v laboratoriju, pri pisanju in urejanju slik. Zahvaljujeva se vama za prijaznost, spodbudo, odgovore na vsa vprašanja in neskončno potrpežljivost.

Hvala osebju Inštituta za predklinične vede, Inštituta za varno hrano, krmo in okolje, kliničnega laboratorija Klinike za male živali in Klinike za male živali Veterinarske fakultete.

Hvala mag. Giti Greccs-Smole za opravljen pregled literature.

Hvala Primožu Stipiču za pomoč pri tehničnem urejanju naloge, za potrpežljivost in podporo.

Vsem, ki so nama pri pisanju naloge pomagali, naju vodili skozi poizkuse in naju vzpodbujali, sva neizmerno hvaležni.

Hvala tudi najinim družinam in prijateljem, ki ste nama v tem času stali ob strani, naju vzpodbujali in včasih tudi tolažili. Vaša moralna podpora je bila v določenih trenutkih ključnega pomena.

9 LITERATURA

Agabou A, Alloui N. Importance of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) as a reservoir for pathogenic bacteria in Algerian broiler houses. *Vet World* 2010; 3: 71–3.

Amadi EN, Ogbalu OK, Barimalaa IS, Pius M. Microbiology and nutritional composition of an edible larva (*Bunaea alcinoe* Stoll) of the Niger Delta. *J Food Saf* 2005; 25: 193–7.

ANSES. Opinion on the use of insects as food and feed and the review of scientific knowledge on the health risks related to the consumption of insects. Maisons-Alfort, France: French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, 2015.

Arlian LG, Schumann JR, Morgan MS, Glass RL. Serum immunoglobulin E against storage mite allergens in dogs with atopic dermatitis. *Am J Vet Res* 2003; 64: 32–6.

Bizikova P, Olivry T. A randomized, double-blinded crossover trial testing the benefit of two hydrolysed poultry-based commercial diets for dogs with spontaneous pruritic chicken allergy. *Vet Dermatol* 2016; 27(4): 289-e70.

doi 10.1111/vde.12302

Bosch G, Zhang S, Oonincx DGAB, Hendriks WH. Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *J Nutr* 2014; 3: e29 (1–4).

doi 10.1017/jns.2014.23

Böhm TMSA, Klinger CJ, Gedon N, Udraite L, Hiltenkamp K, Mueller RS. Effekt eines Insektenprotein-basierten Futters auf die Symptomatik von futtermittelallergischen Hunden. *Tierarztl Prax Ausg K* 2018; 46(5): 297–302 .

Braide W, Oranusi S, Udegbumam LI, Oguoma O, Akobundu C, Nwaoguikpe RN. Microbiological quality of an edible caterpillar of an emperor moth, *Bunaea alcinoe*. *J Ecol Health Environ* 2011; 3: 176–80.

Brazis P, Serra M, Sellés A, Dethioux F, Biourge V, Puigdemont A. Evaluation of storage mite contamination of commercial dry dog food. *Vet Dermatol* 2008; 19(4): 209–14.

Breiteneder H, Mills ENC. Molecular properties of food allergens. J Allergy Clin Immunol 2005; 115(1): 14–23.

Broekman HCH, Knulst AC, den Hartog Jager CF, et al. Effect of thermal processing on mealworm allergenicity. Mol Nutr Food Res 2015; 59(9): 1855–64.

Broekman HCH, Verhoeckx KCM, den Hartog Jager CF, et al. Majority of shrimps allergic patients are allergic to mealworm. J Allergy Clin Immunol 2016; 137(4): 1261–3.

Broekman HCH. Allergenic risks of mealworm and other insects. Utrecht: University of Utrecht, University Medical Center Utrecht, 2017. Doktorska disertacija.

Bu G, Luo Y, Chen F, Liu K, Zhu T. Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. Dairy Sci Technol 2013; 93(3): 211–23.

Cabanillas B, Maleki SJ, Rodríguez J, et al. Allergenic properties and differential response of walnut subjected to processing treatments. Food Chem 2014; 157: 141–147.

Doi 10.1016/j.foodchem.2014.02.025

Charlton AJ, Dickinson M, Wakefield ME, et al. Exploring the chemical safety of fly larvae as a source of protein for animal feed. J Insects Food Feed 2015; 1: 7–16.

Collavo A, Glew RH, Huang YS, Chuang LT, Bosse R, Paoletti MG. House cricket small-scale farming. In: Paoletti MG, ed. Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails. Boca Raton: CRC Press, 2005: 519–44.

EFSA Panel on dietetic products, nutrition and allergies (NDA). Scientific opinion on the safety of “hitin-glucan” as a novel food ingredient. EFSA J 2010; 8(7): 1–17.

EFSA Scientific Committee. Risk profile related to the production and consumption of insects as food and feed. EFSA J 2015; 13: 1–60.

Eilenberg J, Vlak JM, Nielsen-LeRoux C, Cappellozza S, Jensen AB. Diseases in insects produced for food and feed. J Insects Food Feed 2015; 1: 87–102.

El Far M, Li Y, Fédière G, Tijssen P. Lack of infection of vertebrate cells by the densovirus from the maize worm *Mythimna loreyi* (MIDNV). Virus Res 2004; 99: 17–24.

FAO/INFOODS. Food Composition Database for Biodiversity Version 4.0, preglednica 07 Meat. BioFoodComp4.0. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization, 2017. Dostopno na: <http://www.fao.org/infoods/infoods/tables-and-databases/faoinfoods-databases/en/> (16.1.2019).

Farmaki R, Saridomichelakis MN, Leontides L, et al. Dust mite species in the households of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2012; 23(3): 222–e45 .
Doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01052.x.

FASFC/SCH. Food safety aspects of insects intended for human consumption. Common advice of Scientific Committee of the Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC) and of the Superior Health Council (SHC). 2014.

Finke MD. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol* 2002; 21: 269–85.

Fiore C. Effects of temperature and parental age on the life cycle of the dark mealworm, *Tenebrio obscurus Fabricius*. *J N Y Entomol Soc* 1960; 68(1): 27–35 .

Freye HB, Esch RE, Litwin CM, Sorkin L. Anaphylaxis to the ingestion and inhalation of *Tenebrio molitor* (mealworm) and *Zophobas morio* (superworm). *Allergy Asthma Proc* 1996; 17: 215–9.

Gasco L, Biasato I, Dabbou S, Schiavone A, Gai F. Animals fed insect-based diets: state-of-the-art on digestibility, performance and product quality. *Animals* 2019; 9: 170.

Gerland P, Raftery AE, Ševčíková H, et al. World population stabilization unlikely this century. *Science* 2014; 346: 234–237.

Giaccone V. Hygiene and health features of mini livestock. In: Paoletti MG, ed. Ecological implications of minilivestock: role of rodents, frogs, snails and insects for sustainable development. Science Publisher 2005; 579–98.

Goettel MS, Hajek AE, Siegel JP, Evans HC. Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N, eds. *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford, CABI Publishing, 2001: 347–76.

Grau T, Vilcinskas A, Joop G. Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. *Z Naturforsch* 2017; 72: 337–49.

Henneveld K, Beck W, Mueller RS. Evaluation of storage mite contamination of dry dog food and the environment. *Vet Dermatol* 2006; 17: 209 (Abstract).

Hill DS. Pests of stored foodstuffs and their control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002; 14: 135–315.

Hill PB, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 20; 81(3/4): 169-86.

Jackson AP, Foster AP, Hart BJ, Helps CR, Shaw SE. Prevalence of house dust mites and dermatophagoides group 1 antigens collected from bedding, skin and hair coat of dogs in south-west England. *Vet Dermatol* 2005; 16: 32–8.

Jensen RL, Newsom LD, Herzog DC, Thomas JW, Farthing BR, Martin FA. A method of estimating insect defoliation of soybean. *J Econ Entomol* 1997; 70(2): 240–2.

Jeong KY, Son M, Lee JY, Park KH, Lee JH, Park JW. Allergenic characterization of 27-kDa glycoprotein, a novel heat stable allergen, from the pupa of silkworm, *Bombyx mori*. *J Korean Med Sci* 2016; 18–24.

Jones LD, Cooper RW, Harding RS. Composition of mealworm *Tenebrio molitor* larvae. *J Zoo Anim Med* 1972; 3(4): 34–41 .

Jurca J. Osnove imunologije. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2003: 92-93.

Kim SY, Kim HG, Lee KY, Yoon HJ, Kim NJ. Effects of Brewer's spent grain (BSG) on larval growth of mealworms, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Int J Ind Entomol* 2016; 32: 41–8.

Klunder HC, Wolkers-Rooijackers J, Korpela JM, Nout MJR. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control* 2012; 26: 628–31.

Kotnik T. Kožne bolezni psov in mačk. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2016a: 7–10.

Kotnik T. Kožne bolezni psov in mačk. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2016b: 153.

Kotnik T. Kožne bolezni psov in mačk. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 2016c: 170-3.

Leung PSC, Wing Kuen C, Duffey S, Hoi Shan K, Gershwin ME, Ka Hou C. IgE reactivity against a cross-reactivity allergen in crustacea and mollusca: Evidence for tropomyosin as the common allergen. *J Allergy Clin Immuno* 1996; 98: 954–61.

Li Y, Hall RL, Moyer RW. Transient, nonlethal expression of genes in vertebrate cells by recombinant entomopoxvirus. *J Virol* 1997; 71: 9557–62.

Lupi O. Myiasis as a risk factor for prion diseases in humans. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006; 20: 1037–45.

Makkar HPS, Tran G, Heuze V, Ankers P. State-of-the art on use of insects in animal feed. *Anim Feed Sci Technol* 2014; 197: 1–33.

Manojlovic B. A contribution of the study of the influence of the feeding of imago and of climatic factors on the dynamics of oviposition and on the embryonal development of yellow mealworm *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). 1987; 38: 337–48.

Medleau L, Hnilica KA. Small animal dermatology: a color atlas and therapeutic guide. 2nd ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006: 176.

Mueller RS, Olivry T. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): duration of elimination diets. *BMC Vet Res* 2015; 11: e225.

Doi 10.1186/s12917-015-0541-3

Mueller RS, Olivry T. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (4): can we diagnose adverse food reactions in dogs and cats with in vivo or in vitro tests? *BMC Vet Res* 2017; 13: e275.

Doi 10.1186/s12917-017-1142-0

Mueller RS, Olivry T. Adverse food reactions: Pathogenesis, clinical signs, diagnosis and alternatives to elimination diets. *Vet J* 2018; 236: 89-95.

Doi: 10.1016/j.tvjl.2018.04.014.

Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine Drugs* 2010; 8: 292–312.

Nakagaki BJ, Sundae ML, DeFoliart GR. Comparison of the diet for mass rearing *Acheta Domestica* (Orhoptera: Gryllidae) as a novelty food and comparison of food conversion efficiency with values reported for livestock. *J Econ Entomol* 1991; 84: 891–6.

Newton L, Sheppard C, Watson DW, Burtle G. Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. In: Report for Mike Williams, Director of the Animal and Poultry Waste Management Center. Raleigh: North Carolina State University, 2005: 1-17.

Nuttall TJ, Hill PB, Bensignor E, Willemse T, et al. House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2006; 17: 223–35.

Olivry T, Bizikova P. A systematic review of the evidence of reduced allergenicity and clinical benefit of food hydrolysates in dogs with cutaneous adverse food reactions. *Vet Dermatol* 2010; 21(1): 32–41.

Olivry T, Mueller RS. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (7): signalment and cutaneous manifestations of dogs and cats with adverse food reactions. *BMC Vet Res* 2019; 15(1):140.

Doi: 10.1186/s12917-019-1880-2.

Oonincx DGAB, van Itterbeeck J, Heetkamp MJW, van den Brand H, van Loon J, van Huis A. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *Plos One* 2010; 5(12): e14445.

Doi: 10.1371/journal.pone.0014445

Pali-Schöll I, De Lucia M, Jackson H, Janda J, Mueller RS, Jensen-Jarolim E. Comparing immediate-type food allergy in humans and companion animals: revealing unmet needs. *Allergy* 2017; 72(11): 1643–56.

Pereira NR, Tarley CRT, Matsushita M, de Souza NE. Proximate composition and fatty acid profile in Brazilian poultry sausages. *J Food Compost Anal* 2000; 13: 915–20.

Phiriyangkul P, Srinroch C, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Punyarit P. Effect of food thermal processing on allergenicity proteins in Bombay locust (*Patanga Succincta*). *Int J Food Eng* 2015; 23–8.

Pimentel D, Berger B, Filiberto D, et al. Water resources: agricultural and environmental issues. *BioScience* 2004; 54: 909–18.

Ramos-Elorduy J, Gonzalez EA, Hernandez AR, Pino JM. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *J Econ Entomol* 2002; 95: 214–20.

Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119: 247–258.

Ribeiro NTGM. *Tenebrio molitor* for food or feed: rearing conditions and the effects of pesticides on its performance. Coimbra: Escola Superior Agraria, 2007. Doctoral dissertation.

Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(5 Pt 1): 717–28.

Sanderson IR, Walker WA. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* 1993; 104(2): 622–39.

Shockley M, Dossey AT. Insects for human consumption. In: Morales-Ramos JA, Guadalupe Rojas M, Shapiro-Ilan DI, eds. Mass production of beneficial organisms. Amsterdam: Academic Press, 2014: 617–47.

Shostak AW. Hymenolepis diminuta infections in tenebrionid beetles as a model system for ecological interactions between helminth parasites and terrestrial intermediate hosts: a review and meta-analysis. *J Parasitol* 2014; 100: 46–58.

Siemianowska E, Kosewska A, Aljewicz M, et al. Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agric Sci* 2013; 4(6): 287–91.

Smil V. Worldwide transformation of diets, burdens of meat production and opportunities for novel food proteins. *Enzyme Microb Technol* 2002; 30: 305–11.

Srinroch C, Srisomap C, Chockchaichamnankit D, Punyarit P, Phiriyangkul P. Identification of novel allergen in edible insect, *Gryllus bimaculatus* and its cross-reactivity with *Macrobrachium spp.* allergens. *Food Chem* 2015; 184: 160–6.

Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, de Haan C, eds. Livestock's long shadow: environmental issues and options. Rome: Food and Agriculture Organization, 2006.

Strasser H, Vey A, Butt TM. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? Biocontr Sci and Technol 2000; 10: 717–35.

Sun-Waterhouse D, Waterhouse GIN, You L, et al. Transforming insect biomass into consumer wellness food: a review. Food Res Int 2016; 89(1): 129–51.

Swinnen C, Vroom M. The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. Vet Dermatol 2004; 15: 31–6.

Tatiana DMPSY, Bar ME, Oscherov E. Ciclo de vida de *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) en condiciones experimentales. Argentina, Corrientes: UNNE. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, 2000: 1-4.

Thackray AM, Muhammad F, Zhang C, et al. Prion-induced toxicity in PrP transgenic *Drosophila*. Exp Mol Pathol 2012; 92(2): 194–201.

Thind BB, Clarke PG. The occurrence of mites in cereal-based foods destined for human consumption and possible consequences of infestation. Exp Appl Acarol 2001; 25: 203–15.

Thind BB. A new versatile and robust mite trap for detection and monitoring of storage mites in the cereal and allied industries. Exp Appl Acarol 2005; 35: 1–15.

Thind BB. Determination of low levels of mite and insect contaminants in food and feedstuffs by a modified flotation method. J AOAC Int 2000; 183: 113–9.

van Broekhoven S, Bastiaan-Net S, de Jong NW, Wichers HJ. Influence of processing and in vitro digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species. Food Chem 2016; 196: 1075–83.

van Broekhoven S. Risk of mycotoxin contamination of edible mealworms. In: World Mycotoxin Forum, 8th Conference. Vienna, 2014: 40.

Van Hage-Hamsten M, Johansson E. Clinical and immunologic aspects of storage mite allergy. Allergy 1998; 53 (48 Suppl): 49–53.

van Huis A, Itterbeeck JV, Klunder H, et al. Edible insects: future prospects for food and feed security. Rome: Food and Agriculture Organization, 2013.

van Raamsdonk LWD, van der Fels-Klerx HJ, De Jong J. New feed ingredients: the insect opportunity. *Food Addit Contam Part A* 2017; 34: 1384–97.

Verhoeckx KCM, van Broekhoven S, de Hartog-Jager CF et al. House dust mite (Der p 10) and crustacean allergic patients may react to food containing Yellow mealworm proteins. *Food Chem Toxicol* 2014; 65: 364–73.

Verhoeckx K, Bøgh KL, Dupont D et al. The relevance of a digestibility evaluation in the allergenicity risk assessment of novel proteins. Opinion of a joint initiative of COST action ImpARAS and COST action INFOGEST. *Food and Chem Tox* 2019; 129:405 – 423.

Verlinden A, Hesta M, Millet S, Janssens GP. Food allergy in dogs and cats: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46(3): 259–73.

Vidal C, Boquete O, Gude F, et al. High prevalence of storage mite sensitization in a general adult population. *Allergy* 2004; 59: 401–5.

Vollset I, Larsen HJ, Mehl R. Immediate type hypersensitivity in dogs induced by storage mites. *Res Vet Sci* 1986; 40: 123–7.

Weaver DK, McFarlane JE. The effect of larval density on growth and development of *Tenebrio molitor*. *J Insect Physiol* 1990; 36: 531–6.

Womeni HM, Linder M, Tiencheu B, et al. Oils of insects and larvae consumed in Africa: potential sources of polyunsaturated fatty acids. *OCL Oilseeds Fats Corps Lipids* 2009; 16(4/5/6): 230–5.

Xiaoming C, Ying F, Hong Z, Zhiyong C. Review of the nutritive value of edible insects. In: Durst PB, Johnson DV, Leslie RL, Shono K, eds. *Forest insects as food: humans bite back*. Chiang Mei, 2018. Proceedings of a workshop on Asia-Pacific resources and their potential for development. Bangkok: FAO Regional Office for Asia and the Pacific, 2010: 85–92.

Zhao X, Vázquez-Getiérrez JL, Johansson DP, Landberg R, Langton M. Yellow Mealworm Protein for Food Purposes – Extraction and Functional Properties. Plos One 2016; 11(2): e0147791.

Doi 10.1371/journal.pone.0147791

10 PRILOGE

Priloga 1: Vprašalnik za lastnike

DOVOLJENJE ZA ODVZEM KRVI vzorec št. _____ A Z

RAZISKAVA O ALERGENOSTI MOKARJEV

Prostor za nalepko s podatki o lastniku in živali

Spodaj podpisan/a lastnik/ca _____ (ime in priimek)

psa _____ (ime, pasma) dovoljujem, da se odvzeti vzorec krvi testira

na prisotnost protiteles na okoljske alergene in mokarje. Testiranje je brezplačno.

Izpolnil/a sem kratek vprašalnik na drugi strani.

O izvidih me bo obvestil/a veterinar/ka. Vse informacije bodo v raziskavi anonimno uporabljene.

Datum: _____

Podpis lastnika / lastnice psa: _____

Telefon lastnika/ce: _____

VETERINARSKA AMBULANTA (žig)

Podpis veterinarja: _____

VPRAŠALNIK (prosimo obkrožite odgovor):

- | | | |
|---|----------|---------------|
| 1. Ali je vaš pes kadarkoli v življenju imel vnetje ušes? | DA | NE |
| 2. Ali uporabljate čistila za ušesa? | DA | NE |
| 3. Ali ima vaš pes po koži prhljaj? | DA | NE |
| 4. Ali vašemu psu pojačano izpada dlaka? | DA | NE |
| 5. Ali se vaš pes liže po šapah? | DA | NE |
| 6. Ali se vašemu psu kdaj zamašijo paranalne vrečke? | DA | NE |
| 7. Ali se vašemu psu kdaj povečano solzijo oči? | DA | NE |
| 8. Ali se vaš pes kdaj praska bolj, kot običajno? | DA | NE |
| 9. Če se praska bolj kot običajno, je to | SEDAJ | V PRETEKLOSTI |
| 10. Če se praska bolj kot običajno, je to | SEZONSKO | STALNO |

Priloga 2: Dermatološki protokol za klinični pregled psov

Univerza
v Ljubljani
Veterinarska
fakulteta



DERMATOLOŠKI PROTOKOL

ŠT. PROTOKOLA: _____

Podatki o lastniku

Referiran:

FOTO

DA

NE

Razlog prvega obiska:

Dehelmintizacija: Redno ob vacc. Ni podatka

Sredstvo: Datum:

Antiparazitiki (ekto): Redno po potrebi Ni podatka

Sredstvo: Datum:

TELESNA TEŽA: _____

SPLOŠNI PODATKI:

Cepljenja (datum):	Cepivo	Datum
	kombinirano	
	steklina	

Od kdaj imate žival?

Poreklo in podatki o leglu?

OKOLJE ŽIVALI:

Žival živi

stanovanje zunaj oboje

Zunanje okolje/lokacija sprehodov

mesto park travnik
gozd obala tujina
pašnik hribi plavanje

Morebitna potovanja:

Druge živali doma?

Ima kdo v gospodinjstvu (tudi živali) težave s kožo?

DA/NE

PREHRANA:

apetit: _____

žeja: _____

komercialna	meso in ribe	priloge	sadje, zelenjava	mleko	priboljški	drugo

DRUGI PODATKI:

Obolenja dihal:

Gonitev/Libido:

Druge motnje splošnega stanja:

DERMATOLOŠKA ANAMNEZA:

Ali ste opazili:

otresanje z glavo	praskanje okoli uhljev	"vožnjo po riti"	bruhanje
lizanje šap	rane okoli uhljev	mehko blato/drisko	solzne oči
držo glave na stran	sluz v blatu	spremenjen vonj/smradi	
srbež perinealno	kašelj	kihanje	

Pri kateri starosti so se prvič pojavile dermatološke težave?

Kako so izgledale?

Ali so trenutne težave enake kot na začetku?

DA NE

Kdaj so se pojavile trenutne težave?

Na katerem mestu?

Kaj ste opazili prej?

srbež lizanje spremembe

Srbež (1 - 10):

Spremembe so:

sezonske vedno enako intenzivne se poslabšajo (navedi klimatske pogoje)

so tokrat prvič

Spremembe se širijo:

se ne širijo hitro počasi pojav drugačnih kožnih sprememb

Na katera mesta?

PODATKI O ZDRAVLJENJU:

Predhodna diagnostika: ostružek citologija (bris/TIB) otoskopija hemogram biokemija dieta IgE mikrobiološka

Rezultati:

Ali ste trenutne težave zdravili? DA / NE

Odgovor na terapijo: DOBER SLAB PREHODNO IZBOLJŠANJE NIČ BOLJE

Katera zdravila:

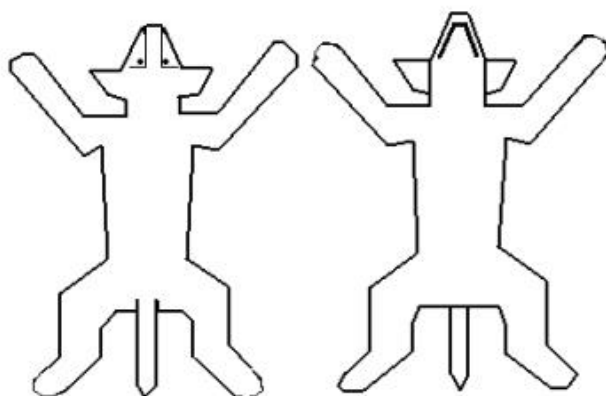
Ste se držali navodil? DA / NE

Kdaj ste nazadnje dali kako zdravilo?

Zdravilo				
Datum				

DERMOGRAM - DISTRIBUCIJA KOŽNIH SPREMEMB

S svinčnikom označite, kje so spremembe. Jakost črt pomeni intenzivnost sprememb. Poleg spremembe označite ustrezno številko iz seznama.



Eflorescence

1. alopecija
2. eritem
3. makula
4. urtika
5. vezikula
6. bula
7. papula
8. pustula
9. epidermalna kolareta
10. ekskoriacija
11. suha seboreja
12. mastna seboreja
13. krusta
14. fisura
15. komedoni
16. ulkus
17. cikatriks
18. lihenifikacija
19. hiperpigmentacija
20. hipopigmentacija
21. hiperkeratoza

Diferencialne diagnoze:

- | | |
|---|---|
| 1 | 4 |
| | 5 |
| 2 | 6 |
| | 7 |
| 3 | 8 |
| | 9 |

Preiskave:

a. Otokopija	L	
	D	
b. Bris sluhovodov		
c. Wood	POZITIVNO NEGATIVNO SUMLJIVO	
d. Citologija	lokacija	
	način odvzema:	
	brs lepilni trak TIB/TIAB	
e. Kožni ostružki	za izvid glej kartoteko	
	lokacija	
	izvid	
f. Trihogram		
g. Pregled prhljaja (mikroskop)		
h. Preizkus z dieto		
i. Mikrobiološka preiskava		
j. Gojiščna preiskava		
k. Intradermalni testi		
l. IgE testi		
m. Biopsija kože		
n. Drugo		

KONČNA DIAGNOZA: