

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BESİN HAZIRLAMADA ÇAPRAZ BULAŞ NEDENİYLE OLUŞAN  
GLUTEN KONTAMİNASYONU ÜZERİNE ÇALIŞMA**

**Dyt. Lütfiye PARLAK**

**Toplu Beslenme Sistemleri Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2018**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BESİN HAZIRLAMADA ÇAPRAZ BULAŞ NEDENİYLE OLUŞAN GLUTEN  
KONTAMİNASYONU ÜZERİNE ÇALIŞMA**

**Dyt. Lütfiye PARLAK**

**Toplu Beslenme Sistemleri Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Derya DİKMEN**

**ANKARA  
2018**

**BESİN HAZIRLAMADA ÇAPRAZ BULAŞ NEDENİYLE OLUŞAN GLUTEN  
KONTAMİNASYONU ÜZERİNE ÇALIŞMA**

**Dyt. Lütfiye Parlak**

Bu çalışma .....18.01.2018..... tarihinde jürimiz tarafından "Toplu Beslenme Sistemleri Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:**

Prof. Dr. Muhittin Tayfur  
Başkent Üniversitesi

**Tez Danışmanı:**

Doç. Dr. Derya Dikmen  
Hacettepe Üniversitesi

**Üye:**

Doç. Dr. Zeynep Göktaş  
Hacettepe Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

**26 Ocak 2018**

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü


## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini

Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

**o Tezimin 25.01.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum. (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)**

25 / 01 / 2018  
  
Lutfiye PARLAK

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Derya DİKMEN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Dyt. Lutfiye PARLAK

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamın planlanmasından tamamlanmasına kadar geçen tüm süreçte değerli bilgileriyle ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve ihtiyaç duyduğum her anda desteklerini esirgemeyen değerli tez danışmanım sayın Doç. Dr. Derya DİKMEN' e,

Bilgi ve tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Zeynep GÖKTAŞ'a,

Eğitim hayatımda desteklerini esirgemeyerek her daim yol göstericim olan sevgili abim Dr. Zafer PARLAK'a,

Zor günlerimde yanımda olan ve benden hiçbir zaman sabırlarını ve desteklerini esirgemeyen çok sevdiğim değerli dostlarım Arş. Gör. Ayşe AKTAŞ, Arş. Gör. Cansu BEKAR, Arş. Gör. Ece YALÇIN ve Arş. Gör. Emine KURTBEYOĞLU ve değerli oda arkadaşlarıma,

Yılların eskitemediği sahip olduğum en değerli dostlarım Derya TAŞKIN ve Ezgi ERCAN'a,

Her konuda daima yanımda olan ve destekleyen çok değerli aileme,

İçtenlikle teşekkür ederim.

## ÖZET

**Parlak L., Besin Hazırlamada Çapraz Bulaş Nedeniyle Oluşan Gluten Kontaminasyonu Üzerine Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Toplu Beslenme Sistemleri Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018.** Bu çalışma, gluten içeren unlu besin hazırlanırken hazırlama alanında bulunan glutensiz ürünlerde ve hazırlama alanında çapraz bulaş nedeni ile oluşabilecek gluten kontaminasyonu düzeyini belirlemek amacı ile yapılmıştır. Bununla birlikte glutensiz besinin; buğday unu içeren besin hazırlama alanı ile arasında bulunması gereken en uygun uzaklık mesafesini ve glutensiz besinin buğday ununa maruziyet süresinin kontaminasyona etkisini belirlemek amaçlanmıştır. Çalışma randomize tek kör çalışma olarak dizayn edilmiştir. Buğday unu içeren besin hazırlama alanından 2 farklı yönde 0,5 m, 1 m, 2 m, 3 m ve 4 m uzaklık mesafelerinde, her noktada 4'er adet olmak üzere toplamda 40 adet glutensiz besin içeren petri kabı yerden 1 m yüksekliğe yerleştirilerek kapakları açılmıştır. Bir profesyonel aşçı tarafından gluten içeren 3 farklı unlu mamül hazırlanmıştır. Uygulama başlangıcından itibaren 30 dk, 1, 2, ve 3 saat sonunda her bir noktaya yerleştirilen örneklerden 1'er adet toplanmıştır. Ayrıca uygulama öncesi hazırlama alanına en yakın bankoya, kullanılan tartının, el yıkama evyesinin, ocağın yanına ve fırının üstüne de 1'er adet glutensiz besin içeren petri kabı konumlandırılarak uygulama sonunda toplanmıştır. Toplanan örnekler ELISA ile analiz edilerek gluten düzeyleri saptanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre tüm örneklerde gluten kontaminasyonu yasal limitin (<20 ppm) altında bulunmuştur. Buğday unu kullanımına maruz kalan örneklerin gluten kontaminasyon düzeyleri, kontrol örneğinin gluten düzeyinden anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ( $P<0,05$ ). Çalışma sonuçlarına göre en fazla kontaminasyon bulaş mesafesinin 0,5 m ve bulaş maruziyet süresinin 1 saat olduğu belirlenmiştir. Kontaminasyon yasal limitin altında olmasına rağmen alerjik bireyler ve çölyak hastalarında risk oluşturmaktadır. Besin hazırlama esnasında oluşabilecek çapraz kontaminasyon ve önleme yöntemleri hakkında üreticiler ve tüketiciler eğitilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Gluten kontaminasyonu, çapraz bulaş, gluten, ELISA.



## ABSTRACT

**Parlak L., Study on Gluten Cross-Contamination In Food Preparation Sites, Hacettepe University Institute of Health Sciences Program of Food Service Systems, Master of Sciences Thesis, Ankara, 2018.** This study was conducted in order to determine; level of gluten contamination in gluten-free foods and preparation site caused by cross-contamination while preparing wheat floured foods. Also, aims of this single-blind randomized study were to assess the optimum distance to prevent gluten contamination and relationship between distance of gluten-free foods from preparation site and between period of preparation of wheat floured foods and level of gluten contamination in gluten-free foods. Totaly 40 gluten-free petri dishes (4 samples in each distance and one meter high from the ground) were placed as uncovered at 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 meters distances from the food preparation site containing wheat flour in two different directions. Three kinds of wheat floured pastries were prepared by a chef. After 0.5, 1,2 and 3 hours from preparation have started, one sample at each distance was collected respectively. In addition, gluten-free petri dishes were placed at next to the nearest bench to preparation site, scale, kitchen sink, stove, on the oven and samples were collected at end of preparing. Gluten contamination levels of the samples were determined by ELISA method. According to this study results, gluten contamination levels of the samples were below the legal gluten limits (<20 ppm). Gluten contamination levels of the samples were significantly different when compared to the control sample ( $p<0.05$ ). Maximum gluten contamination levels were determined 0.5 meter distance from the preparation site and the contamination period was 1 hour. Although gluten contamination levels were below the legal limits, it is still an important risk for allergic individuals and especially for the celiac patients. In order to avoid gluten contamination, producers and consumers should be trained on cross contamination that can occur during food preparation.

**Keywords:** Gluten Contamination, Cross-Contamination, Gluten, ELISA

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLOLAR	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar	1
1.2. Amaç ve Varsayımlar	2
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Toplu Beslenme Hizmeti Veren Kuruluşlarda Besin Güvenliği	4
2.2. Toplu Beslenme Hizmeti Veren Kurumlarda Çapraz Kontaminasyon	5
2.3. Toplu Beslenme Hizmeti Veren Kurumlarda Alerjen Kontaminasyonu	6
2.4. Besin Alerjisi ya da İntoleransına Neden Olan Belirli Madde veya Ürünler	9
2.5. Gluten Yapısı, Sınıflandırması ve Gluten Kompleksi	10
2.6. Gluten ile İlişkili Hastalıklar	12
2.6.1. Otoimmün Hastalıklar	13
2.6.2. Alerjik (İmmün Aracılı) Hastalıklar	18
2.6.3. Otoimmün ve Alerjik Olmayan Hastalıklar	21
2.7. Gluten ile İlgili Yasal Mevzuat	22
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>25</b>
3.1. Araştırma Yeri ve Örneklerin Toplanması	25
3.2. Araştırmanın Planlanması ve Uygulanması	25
3.3. Yöntem	30
3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi	30
<b>4. BULGULAR</b>	<b>32</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>37</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>46</b>

6.1. Sonuçlar	46
6.2.Öneriler	47
<b>7. KAYNAKLAR</b>	49
<b>8. EKLER</b>	
EK -1: Uygulamada Kullanılan Gramajlar	
EK -2: Kit Protokolü	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AOAC</b>	Uluslararası Resmi Analitik Kimyagerler Birliği
<b>A-PAGE</b>	Asit Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>DH</b>	Dermatitis Herpetiformis
<b>ELISA</b>	Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay
<b>FAO</b>	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
<b>FDA</b>	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
<b>FODMAP</b>	Fermente Olabilen Oligosakkaritler, Disakkaritler, Monosakkaritler ve Poliyoller
<b>HACCP</b>	Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
<b>HLA</b>	İnsan Lökosit Antijeni
<b>HPCE</b>	Yüksek Performanslı Kapiler Elektroforez
<b>IEL</b>	İntraepitelyal Lenfosit
<b>IgE</b>	İmmüoglobulin E
<b>M</b>	Molarite
<b>mAb</b>	Monoklonal Antikor
<b>MALDI-TOF MS</b>	Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi
<b>MS</b>	Kütle Spektrometresi
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>NCGS</b>	Çölyak Olmayan Gluten Hassasiyeti
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RP-HPLC</b>	Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>TBS</b>	Toplu Beslenme Sistemleri
<b>TG</b>	Transglutaminaz
<b>WDEIA</b>	Buğdaya Bağımlı Egzersize Bağlı Anafilaksi

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Tahıl proteinlerinin sınıflandırılması	10
2.2. Glutenle ilişkili hastalıkların sınıflandırılması	13
3.1. Uygulama akış şeması	28
3.2. Uygulamanın yapıldığı mutfak planı	29
3.3. Elisa standart eğri grafiği	30
4.1. Buğday unu kullanım alanından artan mesafelerde konumlandırılmış glutensiz besin örneklerinin ortalama gluten konsantrasyonları	34
4.2. Buğday unu kullanımına artan sürelerde maruz kalan glutensiz besin örneklerinin ortalama gluten konsantrasyonları	35
4.3. Konumlandırıldığı yere göre glutensiz besin örneklerinin gluten bulaş düzeyleri	36

**TABLolar**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b>	Bazı tahılların protein ve prolamin içerikleri	11
<b>2.2.</b>	Çölyak hastalığının sınıflandırılması	16
<b>4.1.</b>	Buğday unu kullanım alanına çeşitli mesafelerde yer alan glutensiz besin örneklerinin gluten düzeylerine göre kontrol örneği ile karşılaştırılması	32
<b>4.2.</b>	Buğday unu kullanıma artan sürelerde maruz kalan glutensiz besin örneklerinin gluten düzeylerine göre kontrol örneği ile karşılaştırılması	33

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Kuramsal Yaklaşımlar

Bazı tüketiciler çeşitli sebeplerden dolayı bazı besinlere karşı hayatı tehdit edebilecek reaksiyonlar göstermektedir (1). Bunlar immün aracılı olan (besin alerjileri), otoimmün veya alerjik olmayan (besin intoleransları) ve otoimmün patogenezi olmak üzere farklı fizyolojik yollara sahip reaksiyonlardır (2). Buna rağmen hepsi de spesifik tetikleyici besinlerden kaçınılmasını gerektiren besin duyarlılıklarıdır (3). Dünyada birçok ülkede diyetin temel unsuru olan buğday bu tetikleyici besinlerden biridir. Besin Allerjisi Etiketleme ve Tüketiciyi Koruma Yasası tarafından buğdayın, besin alerjilerinin yüzde doksanına sebep olduğu düşünülen süt, yumurta, fıstık, kabuklu kuruyemişler, soya, balık ve kabuklu deniz ürünlerinin de yer aldığı sekiz majör besin alerjilerinden biri olduğu belirtilmiştir (4-6).

Toplumun bir kesimi buğdayda bulunan gluten proteinine karşı olumsuz reaksiyonlar göstermektedir (7). Gluten, buğday hamurunun nişasta granülleri ve suda çözünür bileşenlerden arındırılmak için su ile yıkandığında kalan proteinli kütle olarak tanımlanmaktadır (7). Kodeks Alimentarius'a göre gluten; buğday, çavdar, arpa ve yulaf gibi tahıllarda veya onların hibritlerinde ve türevlerinde bulunan, bazı bireylerin tolere edemediği, suda ve 0.5 mol /Litre Sodyum Klorür'de çözünmeyen bir protein fraksiyonu olarak tanımlanır (8). Gluten, buğdayın temel depolama proteindir ve doğadaki en kompleks proteinlerden biridir. Gliadin ve glutenin olmak üzere iki fraksiyondan oluşur (9, 10). Gluten proteinleri içerisinde gliadin, olumsuz reaksiyonlara sebep olan başlıca fraksiyondur (7).

Glutenin tüketilmesiyle ortaya çıkan reaksiyonlar "gluten ile ilişkili hastalıklar" olarak adlandırılmaktadır. Bunlar; çölyak hastalığını, gluten ataksisini ve dermatitis herpetiformisi içeren otoimmün patogenezi hastalıklar; buğday alerjisini içeren alerjik mekanizmalarla karakterize hastalıklar ve çölyak olmayan gluten hassasiyetini içeren fakat nedenleri otoimmün yada alerjik olmayan ve patogenezi hala tam olarak anlaşılamamış hastalıklardır (11). Glutenle ilişkili hastalıkların epidemiyolojileri, klinik bulguları ve patolojik mekanizmaları birbirinden farklı olmasına rağmen bu

hastalıkların tedavisi, yaşam boyu gluten içermeyen katı bir diyet uygulamaktır (12). Glutenle ilişkili hastalıklara sahip bireyler gluteni elimine ettikleri katı bir diyet yapmaya çalışsalar da besinlerde gizli gluten bulunması bu çabalarını boşa çıkarmakta ve bu bireylerin sağlıklarını riske atmaktadır (13). Bu sebeple besin hassasiyetine sahip bireyler için ürün etiket bilgisi hayati öneme sahiptir. Dünyada birçok ülke ve kuruluş “glutensiz” olarak etiketlenecek besinlerde bulunabilecek gluten düzeylerinin üst limitini standartlar ve yönetmeliklerle belirlemiş ve gluten hassasiyetine sahip bireylerin sağlığını korumak için yasal düzenlemeler oluşturmuştur. Avrupa Komisyonu, Kodeks Alimentarius, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) gibi kuruluşlarda olduğu gibi ülkemizde de Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından “glutensiz” ve “çok düşük glutenli” olarak etiketlenecek besinlerin gluten içeriği sırasıyla 20 mg / kg ve 100 mg / kg olarak belirlenmiştir (5, 8, 14, 15).

Çapraz kontaminasyon, paketli besin ürünlerinde meydana gelebildiği gibi toplu beslenme yapan kurumlarda da sıklıkla görülmektedir (16). Çapraz kontaminasyon besinlerdeki gizli glutenin başlıca sebebidir ve besin zincirinin her aşamasında meydana gelebilmektedir (13). Toplu beslenme hizmeti veren kurumlarda glutenin çapraz kontaminasyonu, paylaşılan mutfak gereçleri ve üretim alanları, uygun şekilde sterilize edilmediğinde veya restoran personeli tarafından uygulanan yetersiz hijyen prosedürleri nedeniyle ortaya çıkabilmektedir (16).

## **1.2. Amaç ve Varsayımlar**

Bu çalışmanın amaçları;

1. Gluten içeren unlu besin hazırlanırken hazırlama alanına belirli mesafeler içerisinde yerleştirilen glutensiz ürünlerde ve hazırlama alanında çapraz bulaş nedeni ile oluşabilecek gluten kontaminasyonu düzeyini ve gluten kontaminasyonunu engellemek için glutensiz besinin buğday unu hazırlama alanı ile arasında bulunması gereken en uygun minimum uzaklık mesafesini belirlemek.



2. Gluten içeren unlu besinleri hazırlama suresi ile glutensiz besinde meydana gelecek gluten kontaminasyonu arasındaki ilişkiyi belirlemektir.

Bu amaç ile çalışmanın hipotezleri;

1. içeren unlu besinler hazırlanırken, hazırlama alanının diğer alanlara uzaklık mesafesi ile gluten kontaminasyonu arasında ilişki vardır.

2. Gluten içeren unlu besinlerin hazırlama suresi arttıkça ortamdaki gluten kontaminasyonu artmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Toplu Beslenme Hizmeti Veren Kuruluşlarda Besin Güvenliği

Toplu beslenme, insanların bir arada ve ev dışında, bu hizmeti veren kuruluşlar tarafından hazırlanan ve sunulan yiyecek veya yemeklerle beslenmesi olarak tanımlanmaktadır (17). Ev dışında yemek hizmeti sunan lokantalar, oteller, kantinler, kafeler, huzur evleri, sanayi kuruluşları, hastaneler, okullar ve diğer devlet kurumları başta olmak üzere pek çok kurum vardır. İnsanlara ev dışında hazır ya da isteğe göre hazırlanmış yemekler sunan kurumlar, “toplu beslenme servisi yapılan kurumlar” (18) ya da “toplu beslenme sistemleri” (17) olarak adlandırılmaktadır. Turizmin gelişmesi (19), halkın satın alma gücünün artması, bakım evlerinde yaşlı nüfusun artması (20), kadınların çalışma hayatında daha çok yer alması bunun yanı sıra gelişen besin endüstrisi, yeni üretim, paketlenme ve servis sistemleri gibi birçok faktör toplu beslenme hizmetlerinin büyümesine ve insanların çoğunun ev dışında ve başkaları tarafından hazırlanan yiyeceklerle beslenmesinin yaygınlaşmasına katkı sağlamıştır. Günümüzde gelişmiş ülkelerde çalışan insan sayısının artmasına bağlı olarak insanların yüzde doksanı günlük besin tüketimlerinin en az bir öğününü toplu beslenme hizmeti veren kurumlarda tüketmektedir (18).

Toplu beslenme sistemleri (TBS), çoğu zaman tüketilecek büyük miktarda besinin servis öncesinde hazırlandığı ve bir süre depolandığı ve aynı anda geniş kitlelere beslenme hizmeti sunan bir servis sistemidir. Bu sebeple özellikle toplu beslenme hizmeti veren kurumlarda aynı anda büyük miktarlarda yemek hazırlanması besinleri çapraz kontaminasyona daha açık hale getirmektedir (21). Bu yüzden çapraz kontaminasyon nedenli meydana gelen tehlikeler, halk sağlığını tehdit eden önemli bir sorundur (22).

Besin güvenliği, bir besinin amacına uygun bir şekilde hazırlandığı veya tüketildiği zaman tüketiciye zarar vermemesidir (23). Besinlerdeki tehlikeler, besin zincirinin herhangi bir aşamasında ortaya çıkabilmektedir (23). Bu sebeple besin güvenliğini sağlamak için, mümkün olduğunca her yerde Tehlike Analizi ve Kritik

Kontrol Noktaları'na (HACCP) dayalı bir yaklaşım gerekmektedir(23). Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları, besin güvenliğinde önemli olan tehlikeleri tanımlayan, değerlendiren ve kontrol eden, besin güvenliğine yönelik sistematik bir yaklaşımdır (23). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından besin endüstrisinde ve özellikle yiyecek içecek sektöründe besin güvenliğinin sağlanması için, HACCP'e ek olarak, İyi Tarım Uygulamaları, İyi Üretim Uygulamaları ve İyi Hijyen Uygulamalarının da kullanılması önerilmektedir (24).

## **2.2. Toplu Beslenme Hizmeti Veren Kurumlarda Çapraz Kontaminasyon**

Çapraz kontaminasyon, genellikle kontamine olmuş bir üründen, kontamine olmamış bir ürüne bakteri ya da virüsün doğrudan veya dolaylı bir şekilde aktarılması olarak ifade edilmektedir. Kontaminasyon; havadan besine, yüzeyden sıvıdaki besinlere ve temasla beraber yüzeyden besine olmak üzere üç şekilde meydana gelebilmektedir (25). Havadan besine olan kontaminasyon daha çok toz zerrecikleri ve aerosoller aracılığıyla gerçekleşmektedir. Özellikle besinin hazırlanması ve paketlenmesi aşamalarında havadan besine kontaminasyon meydana gelebilmektedir. Yüzeyden sıvıdaki besinlere olan kontaminasyonda ise; sulu ve uygun koşullarda bulunan bakteriler yüzeyde biyofilm oluştururlar. Bu durumda standart temizleme ve sanitasyon ürünleri bakterilerin oluşturduğu biyofilmi yok etmekte yeterince etkili olmadığı için bu yapıların bir kısmı sos, süt gibi besinde kullanılacak sıvıya salınır ve böylece yüzeyden sıvıdaki besine bakteri çapraz kontaminasyonu meydana gelir (25). Bu kontaminasyon meydana geldiğinde oldukça büyük salgınlara sebep olabilmektedir. Yüzeyden besine olan çapraz kontaminasyon ise çiğ besin, ekipman, evcil hayvanlar, patojen taşıyıcılar, kesme tahtaları, bulaşık bezleri, besin tedarikçileriyle temas yoluyla yada besin zincirinin farklı aşamalarında olmak üzere çok çeşitli yollarla ve çeşitli şekillerde meydana gelebilmektedir (25).

Çapraz kontaminasyon genellikle kontamine olmamış besine bakteri veya virüs kontaminasyonu şeklinde ifade edilmesine rağmen bunun yanı sıra besinde olması istenmeyen her türlü maddenin kontaminasyonu için de kullanılabilen bir terimdir. Toplu beslenme sistemlerinde kontaminasyon, çevre kirliliği sebebiyle

hammadde kirliliğinden başlayarak; hammaddenin taşıma, depolama aşamalarında; yıkama, dezenfeksiyon ve sterilizasyon gibi temizlik aşamalarında; ön ısıtma, pişirme ve ısıtma aşamalarında; besinin ambalajlanması, paketlenmiş besin taşınması, depolanması ve dağıtım gibi aşamalarda olmak üzere besin üretiminin her aşamasında meydana gelebilmektedir (22). Toplu beslenme hizmetinde kontaminasyona sebep olabilecek tehlikeler; biyolojik, fiziksel ve kimyasal olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (21, 26). Biyolojik tehlikeler doğal tehlikelerdir ve bu kategoride bulaşıcı bakteriler, toksin üreten organizmalar ve virüsler yer almaktadır (21, 26). Fiziksel tehlikeler; imalat ekipmanından ve ambalajından gelen plastik, metal parçaları, taşlar, cam, mücevherat, saç ve kemikler başta olmak üzere besine yanlışlıkla karışan herhangi bir malzemedir (21, 27). Kimyasal tehlikeler ise çevresel tehlikeleri ve üretim hatalarını temsil eder (26). Bazı katkı maddeleri ve ağır metaller, pestisitler, ilaç kalıntıları, dioksinler gibi besin imalat prosesinde kullanılan temizlik maddeleri de dahil olmak üzere işleme ve paketlenmeden kaynaklı besin kontaminantları ile mantarlar ve toksik algler gibi ekolojik kontaminantları içerir. Ayrıca toplumun bir kesimine alerji yapabilen proteinler de kimyasal tehlikeler içerisinde yer alır (21, 27). Alerjenler ciddi bir besin güvenliği tehlikesi olarak tanımlanır ve yönetimi, gıda güvenliği yönetim sistemlerinin temel alanlarından biridir (28).

### **2.3.Toplu Beslenme Hizmeti Veren Kurumlarda Alerjen Kontaminasyonu**

Besinlerde alerjenlerin bulunması önemli bir sorundur (27). Alerjen bileşene sahip besinler hassas bireylerde birçok immün ve alerjik yanıtı indükleyebilmektedir. Özellikle toplumda, besinlerde bulunan bazı proteinlere karşı IgE antikoru üreten duyarlı bireyler risk altındadır (29). Bu bireyler, doza ve diğer faktörlere bağlı olarak alerjen bileşiklere karşı ölümlü sonuçlanabilecek ciddi reaksiyonlar geliştirebilmektedir (29, 30).

Son yıllardaki veriler, besin alerjenlerinin etkilerinin bireylerin yaşam kaliteleri üzerinde önemli rol oynadığını göstermektedir (31). Toplumda görülen besin alerjisi sıklığı son 20 yılda önemli bir artış göstermiştir (32). Yapılan bir meta-analiz

çalışmasında Avrupa’da yaşam boyu besin alerjisi prevalansı ve nokta prevalansı yaklaşık olarak sırasıyla %17 ve % 6 olduğu sonucuna varılmıştır (32). Çocuklarda ise bu sıklık yetişkinlere göre daha yüksektir (32). ABD Tarım Bakanlığı çocuk nüfusunun % 8’inin besin alerjisine sahip olduğunu belirtmektedir (33). Buna rağmen besin alerjilerinin gerçek insidansı ve prevalansı hala belirsizdir. Bu belirsizliğin başlıca sebepleri ise besin alerjisinin altın standardı olan “çift kör plasebo kontrollü besin yüklemesi” testi kullanan epidemiyolojik çalışmaların az olması (32, 34), besin alerjisinin tanımında ki çeşitlilikler ve reaksiyona sebep olan 170’in üzerinde besin olmasına rağmen çalışmalarda odaklanılan besinlerin genelde aynı besinler olmasıdır (4).

Besin alerjilerinin halen tedavisi mevcut değildir ve bu sebeple besin alerjisine sahip bireylerin bu alerjen bileşikleri içeren besinlerden kaçınması ve onları diyetlerinden elimine etmesi gerekmektedir (28, 31). Fakat besin alerjisine sahip bireylerin besin üreticisi tarafından besinde bulunan alerjen bileşikler konusunda yeterince bilgilendirilmemesi yada istenmeden meydana gelen alerjen kontaminasyonu sonucu besinlerde var olan gizli alerjenler, alerjenik bireylerin eliminasyon diyetlerini uygulamasına engel olabilmektedir (28, 35). Alerjenlerin tolere edilebilme miktarı bireyler arası çeşitlilik göstermektedir. Alerjenlerin çok küçük dozları bile bazı alerjik bireylerde hızlı bir şekilde reaksiyonları tetikleyebilmektedir (31). Alerjenik bileşenler besin formülasyonunun bir bileşeni olabileceği gibi, besin üretim ve imalat aşamalarında alerjen bileşikler ile kontamine olabilir (31). Çapraz kontaminasyon besinlerdeki gizli alerjenlerin varlığının başlıca kaynağıdır ve besin zincirinin her aşamasında meydana gelebilir (35, 36). Ortak kullanılan tarım alanları, çiftlik ekipmanları ve depolama alanları, işleme tesisleri ve işleme ekipmanları alerjen besinin çapraz kontaminasyon kaynağı olabileceği gibi evlerde, lokantalarda ve diğer toplu beslenme yapan kurumlarda ortak kullanılan besin hazırlama alanları, mutfak ekipmanları ve çalışma yüzeyleri de birer kontaminasyon kaynağıdır (30, 35). Bu sebeple sadece alerjen bileşenleri içeren besin maddesinin diyetten çıkarılması yetmemekte ve besinle ilişkili yüzeylerdeki alerjen

bileşiklerinde yıkama ya da dezenfeksiyon gibi işlemlerle azaltılması ya da elimine edilmesi gerekmektedir (36).

Besin alerjenleri gittikçe artan bir endişe haline geldiği için, gizli alerjenler sadece besin endüstrisinin değil; restoranlar, yiyecek- içecek firmaları ve kantinler gibi diğer toplu beslenme yapan kurumlar da dahil olmak üzere besin tedarikinde görev alan herkes için ciddi bir sorundur (30, 35, 37). Ülkelere göre değişmekle beraber paketli besinlerde, besin etiketinde alerjen besinin bildirilme zorunluluğu olmasına rağmen toplu beslenme yapan kurumlarda böyle bir zorunluluk bulunmamaktadır (35). Bu sebeple alerjik bireyler toplu beslenme yapan kurumlarda besin içeriğini bilmedikleri için alerjen bileşenlerden kaçınmada büyük sorun yaşamaktadır (35). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl 30.000 bireyin besin alerjisi yüzünden hastane acil servisine müracaat ettiği ve 150 bireyin ise besin alerjisine bağlı gelişen anafilaksiye bağlı olarak hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir (38). Çapraz kontaminasyondan kaynaklı alerjik reaksiyon geçirme sıklığı tam olarak bilinmemektedir (35). Fakat besin kaynaklı alerjik reaksiyon vakalarının sayısının büyüklüğü göz önünde bulundurulursa, çapraz kontaminasyon kaynaklı alerjik reaksiyon vakalarının sayısının da oldukça büyük olması beklenmektedir (35). Yapılan çalışmalarda birçoğu ölümlü sonuçlanan besin alerjisi reaksiyonlarının çoğunun restoranlarda hazırlanan yemeklerden dolayı meydana geldiği gösterilmiştir (39, 40). Bu reaksiyonların bir kısmının restoran mutfaklarında meydana gelen çapraz kontaminasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir (35, 40). Toplu beslenme hizmeti veren kurumlarda çapraz kontaminasyon özellikle besin hazırlama alanlarının sınırlı ve özel donanımın yetersiz olduğu toplu beslenme yapan kurum mutfaklarında gerçekleşmektedir (35). Çapraz kontaminasyonun kaynağı olarak fritözlerde ve ızgaralarda yağların ortak kullanılması, alerjen bileşen içeren besinleri hazırlamak ve sunmak için aynı çalışma yüzeyleri ve fritöz, ızgara, mikser, tava gibi mutfak ekipmanlarının kullanılması sayılabilir (35, 36, 40). Ayrıca yiyecekler süslenirken aynı ellerin ya da eldivenin kullanımı da mutfakta ki çapraz kontaminasyonun başlıca kaynaklarından biridir (40). Bunların dışında alerjen besinlerin pişirilmesi sırasında ortaya

çıkan buharları bile, bazı alerjen bireyler tarafından solunduğunda ciddi reaksiyon geliştirmelerine neden olabilmektedir (40, 41).

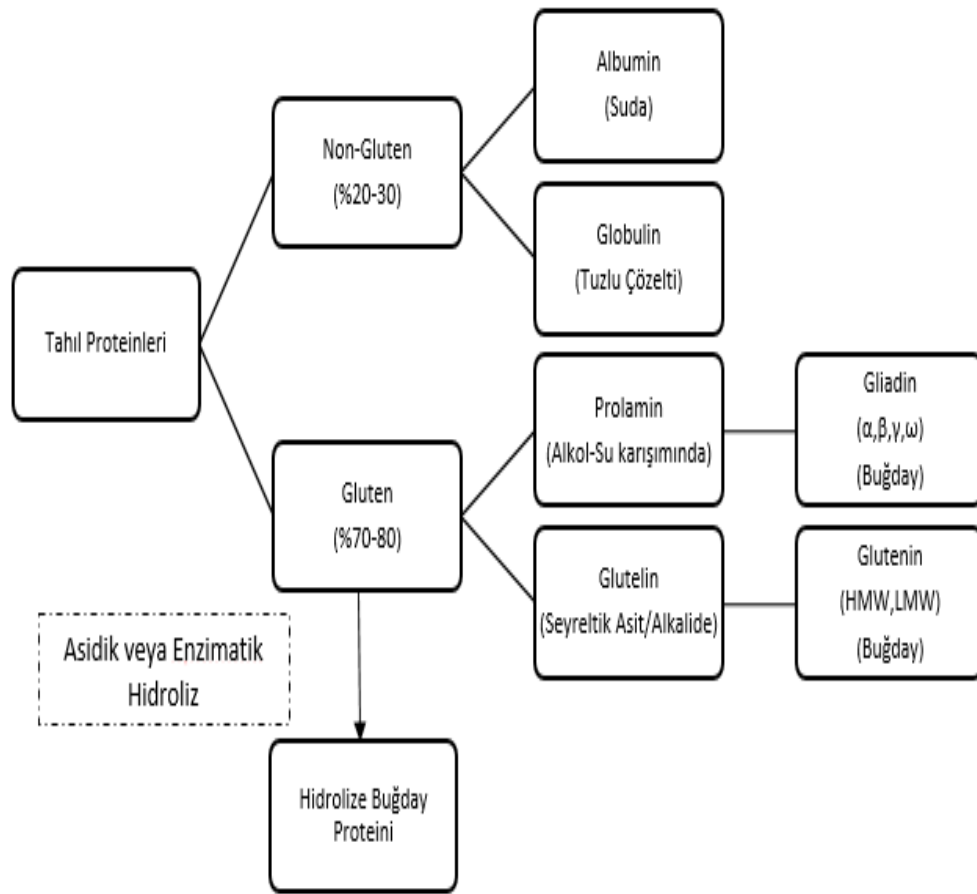
#### **2.4. Besin Alerjisi ya da İntoleransına Neden Olan Belirli Madde veya Ürünler**

Kodeks Alimentarius Komisyonu paketli besinlerin etiketlenmesi genel standardında dünyada en yaygın ve en şiddetli besin hassasiyetine neden olan besinleri ve besin bileşenlerini; gluten içeren tahıllar, eklem bacaklı kabuklular, yumurta, balık, yerfıstığı, soya fasulyesi, süt, kabuklu kuruyemişler, 10 mg / kg veya daha fazla konsantrasyonda sülfat ve tüm bunların ürünleri şeklinde listelemiştir (42). Besin hassasiyetine sahip bireylerin, reaksiyonları önlemek için bu tetikleyici bileşenlerden kaçınmaları gerekmektedir (43). Bu da besinin içeriğinde yer alan maddelerin doğru ve eksiksiz olarak besinin etiketinde yer almasına bağlıdır (43). Bu yüzden besinlerin etiket bilgisi besin hassasiyetine sahip bireyler için hayati bir önem taşımaktadır (31).

Besin etiketleri, besinin alerjen durumunu yerel dilde, basit ve tüketicinin kolayca anlayabileceği şekilde gösterilmesini sağlayan önemli araçlardır (29). Bazı ülkeler ve uluslararası kuruluşlar tarafından besin alerjenleri için besin etiketinde bildirmeyi zorunlu kılan kanunlar, yönetmelikler ve standartlar belirlenmiştir (30, 43). Ülkemizde Türk Gıda Kodeksi Gıda Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliğine göre alerjiye veya intoleransa neden olan belirli madde veya ürünlerin ürün etiketinde bildirilmesi zorunludur. Bu bilgi listenin geri kalan bölümünden açıkça ayıran bir yazı dizgisi vasıtasıyla vurgulanmalıdır. Eğer gıdanın bileşenler listesi yok ise alerjiye veya intoleransa neden olan madde veya ürün adlarını takiben "içerir" kelimesi kullanılarak belirtilmelidir (44). Gluten içeren tahıllar, çavdar, arpa, yulaf veya bunların hibrit türleri ve bunların ürünleri de ürün etiketinde bildirilmesi zorunlu olan ürünler arasındadır. Gluten, Türk Gıda Kodeksi Gıda Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliğine göre bazı bireylerin duyarlı oldukları, suda ve 0,5 Molarite (M), sodyum klorür (NaCl) çözeltisinde çözünmeyen ve buğday, çavdar, arpa, yulaf veya bunların melez çeşitlerinden ve türevlerinden gelen bir protein fraksiyonu olarak tanımlanmaktadır (44).

## 2.5. Gluten Yapısı, Sınıflandırması ve Gluten Kompleksi

Tahıl proteinleri ilk olarak 1924 yılında Osborne tarafından temel olarak çözümlülüklerine göre; suda çözünen proteinler (albuminler), seyreltik tuzlu çözeltide çözünenler (globulinler), alkol/su karışımında çözünenler (prolaminler) ve seyreltik asit/ alkalide çözünenler (glutelinler) olmak üzere sınıflandırılmıştır (Şekil 2. 1.) (45, 46).



**Şekil 2. 1.** Tahıl proteinlerinin sınıflandırılması (7, 46, 47).

Albumin ve globulin, tahılın gelişimi süresince fonksiyonel işlevler gösteren metabolik proteinler iken; prolaminler ve glutelinler olarak adlandırılan gluten proteinleri ise yalnızca tahıl tanelerinin endospermde bulunan ve tahıl proteininin %70-80'ini oluşturan depolama proteinleridir (7, 48). Geriye kalan tahıl proteinleri ise enzimler



ve enzim inhibitörleri, membran ve lipoproteinler gibi yapısal proteinlerdir (7). Prolamin, bileşiminde yüksek miktarda prolin ve glutamin içermesine rağmen (45, 49) lisin ve triptofan içeriği ise çok düşüktür (49). Buğdaydaki depolama proteinleri gliadin (prolamin) ve glutenin (glutelin), çavdardaki secalin, arpadaki hordein, yulaftaki avenin, mısırdaki zein, pirinçteki oryizin ve darıdaki kafirin olarak adlandırılmıştır (7, 48). Buğday, arpa, çavdar ve yulafta glutelin ile prolamin neredeyse eşit miktardadır (Tablo 2. 1.) (50). Bu da su ile birleştiğinde gluten kompleksini oluşturur. Fakat mısırdaki glutelin düşük iken prolamin yüksektir. Pirinçte ise glutelin yüksek, prolamin düşüktür. Bu sebeple mısırdaki ve pirinçte gluten kompleksi oluşumu gözlenmez (50).

**Tablo 2. 1.** Bazı tahılların protein ve prolamin içerikleri (50).

Tahıl	Prolamin Türü	% Protein	% Prolamin
Buğday	Gliadin	10 -15	4,0-7,5
Çavdar	Secalin	9-14	3,0-7,0
Arpa	Hordein	10-14	3,5-7,0
Yulaf	Avenin	8-14	0,8-2,1
Mısır	Zein	7-13	3,5-7,0

Gluten, buğday hamuru, nişasta granülleri ve suda çözünür bileşenlerden arındırılmak üzere yıkandığında kalan lastik benzeri kütle olarak tanımlanabilir. Fakat pratikte 'Gluten' terimi proteinleri ifade eder (10). Kodeks Alimentarius'a göre gluten; buğday, çavdar, arpa ve yulaf gibi tahıllarda veya onların hibritlerinde ve türevlerinde bulunan, bazı bireylerin tolere edemediği, suda ve 0.5 mol /L NaCl'de çözünmeyen bir protein fraksiyonu olarak tanımlanır (8). Aslında gluten son derece karmaşık bir kimyasal yapıya sahiptir (51). Ya monomer olarak ya da zincirler arası disülfid bağlarıyla oligo- ve polimerler olarak bulunan yüzlerce protein bileşeni içerir (10). Gluten temel olarak gliadinler ve gluteninler olmak üzere buğday ununun iki temel fraksiyonundan oluşur (51, 52). Ayrıca farklı gliadin tiplerine ve glutenin tiplerine sınıflandırılır (7, 51, 53).

Gliadin fraksiyonu, su ve tuz çözeltilerinde çözünmeyen ancak sulu alkollerde çözünen, hidrojen bağları ile bağlı tek zincirli polipeptidleri temsil eder (46, 54).

Gliadinlerin moleküler ağırlığı 28,000 ila 55,000 arasında değişmektedir (54). Gluteninler ise suda, tuz çözeltilerinde ve sulu alkollerde çözünmezken; seyreltik asitler, bazlar veya deterjan ya da ayrıştırıcı ajanlar içeren çözeltilerde kısmen çözünürler (7). Moleküller arası disülfid bağlarıyla bağlı polimerik proteinlerdir (46). Moleküler ağırlığı 60,000 ile 10 milyon arasında değişmektedir (54).

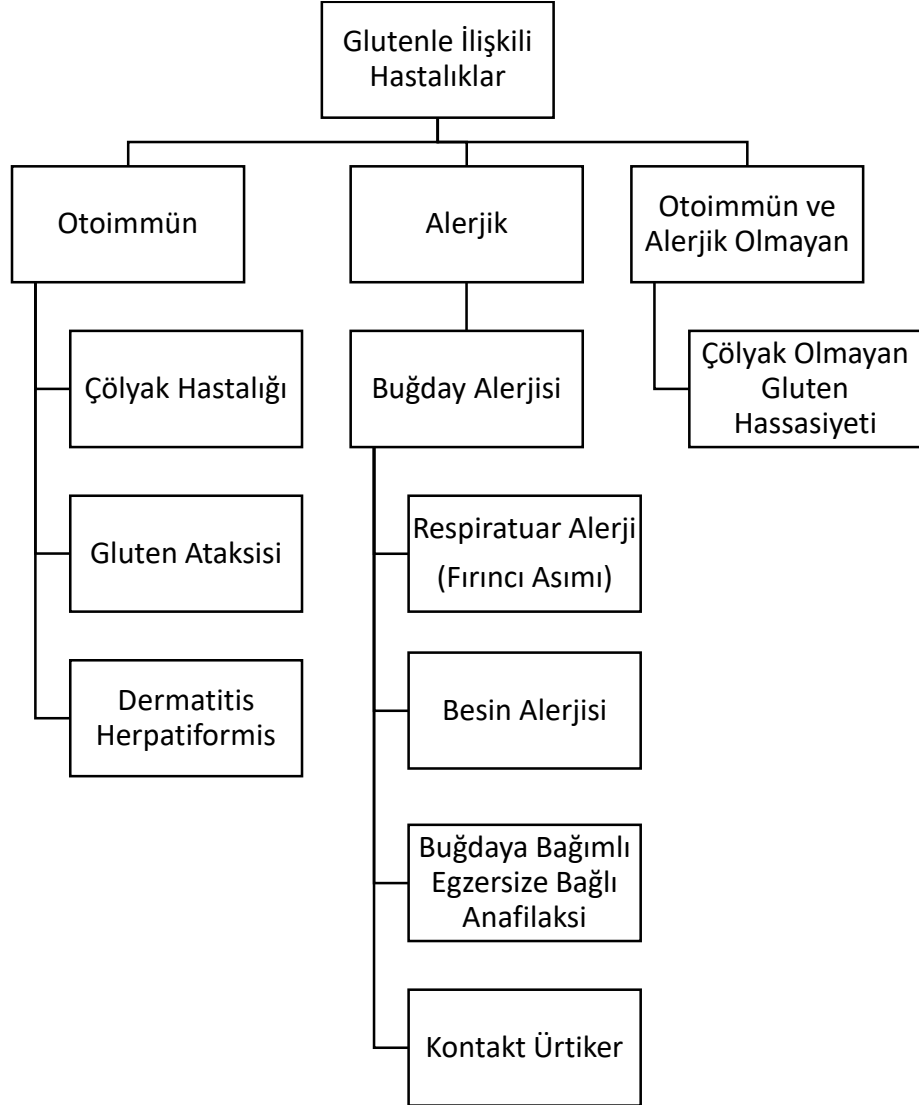
Gluten proteinlerinin her iki fraksiyonu da hamurun reolojik özelliklerine katkıda bulunur ve pişirme kalitesinde önemli rol oynar, ancak fonksiyonları farklıdır (7, 10, 52). Hamurun viskoelastik özelliklerini ve son ürünün kalitesi için her iki fraksiyonun uygun bir şekilde karışması gereklidir (10). Bu sebeple gliadin/glutenin oranı çok önemlidir (48). Hidrate gliadinlerin elastikiyeti azdır, gluteninlerden daha az yapışkandır ve hamurun viskozitesinden ve uzayabilirliğinden sorumludur. Hidrate gluteninler ise hem yapışkan hem de esnektir ve hamurun dayanıklılığından ve elastikiyetinden sorumludur (10).

## 2.6. Gluten ile İlişkili Hastalıklar

Yaklaşık 10.000 yıl önce tahıl yetiştiriciliğinin dünyaya yayılmasıyla beraber, tahıllar insan diyetinin temel parçası haline gelmiştir. Bununla beraber bazı bireyler bu yeni besinlere uyum sağlayamamıştır ve bazı tahıllara karşı immünolojik tolerans geliştirmiştir. Buğdayın gluten proteinleri (gliadin), zararlı immün yanıtlara sebep olan başlıca ajanlardır (7). Benzer immünojenik özellikler gösteren diğer prolaminler de çavdar (sekalinler), arpa (hordein) ve diğer aynı aileden olan tanelerde bulunur. Fakat ayrı bir prolamin ailesinden olan mısırın prolamini (zein) ise immünojenik özellikler göstermez iken, yapısal olarak diğer prolamin fraksiyonlarından farklı olan yulaf prolamini (avenin) ise çoğu gluten intoleransına sahip bireyde immünolojik etki göstermemektedir (49, 53, 55, 56).

Glutenin tüketilmesiyle meydana gelen bir dizi durum “gluten ile ilişkili hastalıklar” terimi ile belirtilmektedir. Bunlar; çölyak hastalığını içeren otoimmün patogenezi hastalıklar, buğday alerjisini içeren alerjik mekanizmalarla karakterize hastalıklar ve nedenleri otoimmün ya da alerjik olmayan ve patogenezi hala tartışılan

çölyak olmayan gluten hassasiyetidir (11). Glutenle ilişkili hastalıkların sınıflandırılması Şekil 2.2.' de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Glutenle ilişkili hastalıkların sınıflandırılması (57)

### 2.6.1. Otoimmün Hastalıklar

#### Çölyak Hastalığı

Çölyak hastalığı, buğday, arpa, çavdar ve muhtemelen yulaftan gelen glutenin tüketilmesi sonucu, genetik olarak duyarlı bireylerde ince bağırsağın (duodenum, jejunum) mukozasının hasar gördüğü inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanır (7). Çölyak hastalığı, immün aracılı bir enteropati olup, belirtiler genellikle aşamalı olarak,

gluten tüketiminden haftalar hatta yıllar sonra ortaya çıkmasıyla karakterizedir (57). Aslında literatürde çölyak hastalığı; sorumlu besin antijeni gluten olduğu için kısmen besin hassasiyeti bozukluğu olarak, kısmen de doku transglutaminazlara (TG) , diğer transglutaminazlara (TG3 ve TG6) ve endomizyuma karşı serum otoantikörlerinin varlığı sebebiyle otoimmün bir durum olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple çölyak hastalığı aslında otoimmün bileşenli, immün aracılı bir besin hassasiyeti olarak tanımlanabilir (7). Çölyak hastalığı sprue yada glutene duyarlı enteropati olarak da adlandırılır (58). Hastalık gluten alımıyla başlar ve bir dizi immünolojik süreçten sonra, mukozal hasara ve ince bağırsak villusunda atrofiye yol açar ve malabsorbsiyon ile sonuçlanır (9, 49, 58). Çölyak hastalığı geçmişte çocukluk hastalığı olarak düşünülmesine rağmen, yapılan modern araştırmalar çölyak hastalığının her yaşta ve cinsiyette ortaya çıkabilen ve dünya genelinde en sık görülen besin hassasiyetlerinden biri olduğunu ortaya çıkarmıştır (7). Her yüz kişiden birinin çölyak hastası olduğu tahmin edilmektedir (59).

Çölyak hastalığı insan lökosit antijenleri (HLA) sınıf II alelleri olan HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 ile ilişkilidir (7, 49). Hastaların %90-95'inde HDL-DQ2 pozitifdir (54). Geriye kalan hastalarda ise HLA-DQ8 pozitifdir. Birkaç çölyak hastasında HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 negatif olmasına rağmen, yine de bu genlerin olmaması hastalığın güvenilir bir negatif belirleyicisi olarak kabul edilmektedir (7). Çölyak hastalığının patofizyolojisi üzerine çalışmalar yapılmasına rağmen halen tam olarak açıklanamamaktadır. Fakat genetik faktörlerin çölyak hastalığının patogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Greco ve arkadaşlarının (60) yaptığı bir çalışmada çölyak hastalığının monozigot ikizlerde %75 gibi yüksek bir oranda, çift yumurta ikizlerinde ise yaklaşık %11 oranında birlikte görülme sıklığına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca çölyak hastalığı kadınlarda erkeklere oranla iki kat fazla görülmektedir (7).

Temel olarak gluten fraksiyonlarından biri olan ve prolinlerden ve glutaminlerden zengin olan gliadin fraksiyonu, gluten toksisitesinden sorumludur. Gliadinler immünojenik peptitleri içerir ve hücrede doğrudan bir sitotoksik etki gösterebilmektedir (9). Bu yüzden gliadinler, gluteninlerden daha toksiktir ve

gliadinler içinde ise en toksik fraksiyon  $\alpha$ -gliadinlerdir.  $\gamma$ -ve  $\omega$ -gliadinler ise daha düşük toksisiteye sahiptir (51).

Çölyak hastalığının ortaya çıkmasında kazanılmış immün yanıt ve doğal immün yanıt olmak üzere iki immün yanıt rol oynar (61). Kazanılmış immün yanıtta hasta tarafından alınan gluten, pankreas ve intestinal enzimler tarafından tamamen aminoasitlerine parçalanamaz ve 33 aminoasitli gliadin türevi toksik peptitler arta kalır (49). Bu peptitler antijeniktir ve tüm gastrik, pankreatik ve intestinal enzimlere karşı dirençlidir (7, 49). İntestinal membrandan kolay bir şekilde içeri alınarak doku transglutaminazı tarafından transamidasyona ve deamidasyona uğrattılır (7). Bu reaksiyonlar sonucunda negatif yüklü glutamik asit parçaları oluşur. Bu parçalar HLA molekülü üzerinde yer alan pozitif yüklü antijen bağlama alanlarına yerleştirilir. Böylece özellikle HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 kompleksleri ile gliadin peptit bağları oluşur (7, 58). Bunlar glutene duyarlı CD<sup>+</sup> T hücrelerine antijenik olarak sunulur (7). Böylece lenfositler aktive olur ve sitokin salınımına neden olarak şiddetli bir immün reaksiyonu tetiklerler (61). İntestinal hücre hasarı meydana gelir ve bağırsak mukozasının kronik inflamasyonu başlar ve bu süreç villüs atrofisi ile sonuçlanır (58). Doğal immün yanıtta ise CD<sup>+</sup>T hücreleriyle kazanılmış immün mekanizmasının yanı sıra intraepitelyal CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositlerle ilişkili bir doğal yanıt da rol oynar (61). Hastalarda gluten, intraepitelyal lenfositlerden (IEL) İnterlökin-15 sitokininin aşırı üretimine neden olarak CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin yüzeyinde aktive olan doğal öldürücü hücre reseptörlerinin ekspresyonunu artırır. Bu da T hücrelerinedoğal öldürücü hücre benzeri özellik kazandırarak T hücrelerinin bağırsak hücrelerine saldırmasına sonucu bağırsak atrofisine neden olur (61).

Çölyak hastalığıyla ilişkili çok sayıda semptom mevcuttur. Asemptomatikten acil müdahaleyi gerektirecek tabloya kadar değişebilen bir spektrumu içerir. Başlıca semptomlar; diyare, steatore, kusma, karın ağrısı, karında şişkinlik, yorgunluk, huzursuzluk, iştahsızlık, ağırlık kaybı, ödem, hipoproteinemi, hipokalemi ve çocuklarda büyüme geriliğidir (7, 62). Fakat konstipasyon, kilo alma, gastroözafajeal reflü gibi klasik olmayan semptomlar da görülebilir (7).

Literatürde çölyak hastalığının klinik sınıflandırılmasında yıllardır fikir birliğine varılamamasına rağmen, güncel kaynaklara göre çölyak hastalığının sınıflandırılması Tablo 2.2.' de verilmiştir.

**Tablo 2.2.** Çölyak Hastalığının Sınıflandırılması (55).

<b>Çölyak Hastalığı Sınıfları</b>	<b>Semptom Durumu</b>
Asemptomatik Çölyak Hastalığı	Semptom olmamasına rağmen genel toplum taramalarında teşhis
Klasik Çölyak Hastalığı	Diyare, kilo kaybı, malnutrisyon veya malabsorbsiyon semptomları
Non-Klasik Çölyak Hastalığı	Malabsorbsiyon semptomları olmamasına rağmen, konstipasyon, abdominal ağrı
Subklinik Çölyak Hastalığı	Çölyak testi için yeterli bulgu ve semptom göstermeyen, klinik deteksiyon eşliğinin altında kalan
Semptomatik (Overt) Çölyak Hastalığı	Ya intestinal yada ekstra intestinal semptomların varlığı
Refrakter Çölyak Hastalığı	Glutensiz bir diyet uygulamasına rağmen, villus atrofi ve kalıcı semptomlar
Potansiyel (Latent) Çölyak Hastalığı	Pozitif serolojik testler ve normal intestinal biyopsi

Yaşamın ilerleyen dönemlerinde çölyak hastalığı için tanımlanan tek risk faktörü HLA genleri olmasına rağmen; perinatal ve çocukluk dönemi enfeksiyonları, bağırsak mikrobiyotası, emzirme, bebeğin gluten içeren besinlerle tanışma yaşı, doğum şekli, hijyen standartları antibiyotik ve proton pompa inhibitörleri kullanımı gibi çevresel faktörlerin etkileri de halen tartışılmaktadır (63).

Çölyak hastalığının temel tedavi yöntemi, gluten içeren her türlü besinin diyetten elimine edildiği glutensiz diyet uygulamaktır (56). Bireyler ancak bu diyeti

uyguladıkları taktirde hastalık semptomlarını kontrol edebilir ve intestinal ve ekstraintestinal komplikasyonlardan kaçınabilirler (56).

### **Gluten Ataksisi**

Genetik olarak duyarlı bireylerin gluten alımıyla tetiklenen serebellum hasarı ile karakterize immün aracılı bir hastalıktır (57, 64). Gluten duyarlılığının serolojik kanıtları varlığında sporadik ataksi olarak adlandırılır (64). Gluten ataksisi 1996 yılında tanımlanmıştır ve sinsice ilerleyen bir hastalık olup, hastalığın ortalama başlangıç yaşı 53'tür (65). Çölyak hastalığında olduğu gibi gluten ataksisi de, çölyak hastalığının oluşumunda risk faktörü olan HLA-DQ2 ve DQ8 genleri ile ilişkilidir. Gluten ataksisinde serebral kortekste bulunan purkinje hücrelerindeki antijenik epitoplara ile gluten peptitleri arasında antikor çapraz reaksiyonu vardır (64). Gluten ataksili hastalarda beyin damarlarının etrafında transglutaminaz antikorlarının yaygın şekilde tutulumu mevcuttur (57). Hastalık öncelikle yürüyüş ataksisi ile karakterizedir ve ekstremitelerde ataksisi mevcuttur (7). Gluten enteropatisine rağmen gastrointestinal semptomlar nadir görülmektedir (64). Vakaların %80'inde serebellum disfonksiyonunun oküler bulguları görülür (57). Gluten ataksisinde de diğer otoimmün hastalıkların prevalansı artmaktadır. Hastalarda uzun süre glutene maruziyet, geri dönüşsüz olarak serebellumdaki purkinje hücrelerinin kaybedilmesiyle sonuçlanır. Ancak erken teşhis ve katı bir glutensiz diyetle tedavi, hastalığın ilerlemesini ve kalıcı sakatlığı önleyebilir (64, 65).

### **Dermatitis Herpetiformis**

Dermatitis Herpetiformis (DH), aslında çölyak hastalığının ciltle ilgili bir bulgusudur (66). Cildin çölyak hastalığı olarak da adlandırılır (66). İlk olarak Louis Durhing tarafından 1884 yılında tanımlanmıştır (67). Her yaşta görülebilen bir hastalıktır fakat genellikle erişkinlikte ortaya çıkar ve yaşam boyu devam eden kronik, tekrarlayan bir hastalıktır (68, 69). Neredeyse tüm hastalarda çölyak hastalığı bulunsa da sadece çok az bir kısmında tekrarlayan ishal ve intestinal malabsorbsiyonun eşlik ettiği semptomlar gözlenir (68). Hastalıkta güçlü bir genetik yatkınlık mevcuttur.

Hastaların %95'inde HLA-DQ2 ve DQ8 genleri pozitiftir (69, 70). Epidermal transglutaminaz, DH'nin hedef otoantijeni olarak tanımlanmıştır (71) ve DH'li hastalarda doku transglutaminaz ve epidermal transglutaminaza karşı serum IgA antikoru mevcuttur (66). Dermatitis Herpetiformis'de, epidermisde veya dermal-epidermal junksiyonda antikor veya kompleman bileşiklerinin birikimi olur (68). Cilt lezyonlarının morfolojisi ve dağılımı, hastalığın ayırt edici özellikleridir (70). Dermatitis Herpetiformis, 1-3 mm'lik büyük papüller, seropapüller, veziküller, küçük kabarcıklar, kabuklu erozyonlar ve ekzoriyasyon ile karakterize, kronik ve şiddetli kaşıntılı bir deri hastalığıdır. El ve ayak parmaklarında purpura görülebilir (69). Kronik kaşıntı ve ekzoriyasyon, likenifikasyona neden olabilir (69). Dirsekler, dizler, kalçalar, omuzlar, sırtın orta çizgisi, kafa derisinde meydana gelen cilt işaretleri hastalık için karakterizedir ve tanı için belirleyicidir (69). DH için en önemli tedavi sıkı bir glutensiz diyettir (72). Hastaların glutensiz diyet alımıyla beraber antikor düzeylerinde kademeli olarak azalma gözlenmektedir (71). Hastalığa ait cilt ve gastrointestinal semptomlar hafiflemektedir (71, 72). Hastalık kronikleşme eğilimi gösterir fakat tetikleyici bir etken olmadığında zamanla bulgular kaybolur (71). Bu sebeple uygulanan glutensiz diyetle beraber deri bulguları zamanla kaybolmasına rağmen yine de hastaların glutensiz diyetle devam etmesi önerilir. Ayrıca glutensiz diyetin, lenfomaların ve çölyak hastalığıyla ilişkili hastalıkların ve malabsorpsiyonun gelişimini önlediği görülmektedir (69). Bazen bağırsak hasarına bağlı olarak laktoz intoleransı da HD'e eşlik edebilir. O zaman bu hastalara laktoz ve gluten içermeyen bir diyet önerilir (69).

## **2.6.2. Alerjik (İmmün Aracılı) Hastalıklar**

### **Buğday Alerjisi**

Codex Alimentarius, buğday ve diğer gluten içeren tahılların aşırı duyarlılığa neden olan en önemli sekiz besin maddesinden biri olduğunu belirtmiştir (42). Buğday alerjisi, buğday proteinlerine karşı immünolojik reaksiyon olarak tanımlanır (7). Buğday proteinlerinin her iki fraksiyonu da buğdaya karşı duyarlılık gelişmesinde rol oynamaktadır (73). Buğday alerjisindeki alerjenler gluteni de içermesine rağmen



yalnızca glutenle sınırlı değildir (74). Peroksidaz, spesifik olmayan lipid transfer proteini ve alfa-amilaz tripsin inhibitörleri gibi gluten olmayan proteinler, buğday alerjisiyle ilgili hem solunum hem de gastrointestinal sistemler ile ilişkilidir. Gluten proteinlerinden olan gliadin ise daha çok buğday tüketimine bağlı immünoglobulin E (IgE) aracılı reaksiyonlarla ilişkilidir (73).

Buğday alerjisinin patogeneğinde IgE antikoru rol oynamaktadır (7). Bazen çölyak hastalığının ve buğday alerjisinin gastrointestinal bulguları birbirinden ayırt edilemez fakat çölyak hastalığı buğday alerjisinde olduğu gibi anafilaktik şoka neden olmaz (75). Bununla birlikte, çölyak hastalığının aksine buğday alerjisi, akut tedaviden sonra kalıcı gastrointestinal veya diğer organ hasarına neden olmaz (75). Ayrıca buğday alerjisine bağlı semptomların buğday tüketiminden dakikalardan saatlere varan bir zaman aralığı içerisinde ortaya çıkması, buğday alerjisini diğer glutenle ilişkili hastalıklardan ayırır (76). Buğday alerjisi semptomları gastrointestinal sistemde ortaya çıktığı gibi, ciltte veya solunum sisteminde de ortaya çıkabilir (75). Dudak, dil, ağız, burun, gözler ve boğazda şişme, kaşıntı ve iritasyon şikâyetleri meydana gelebilir (75). Hırıltılı solunum, nefes darlığı ve nadiren anafilaksi gözlenebilir. Gastrointestinal sistemde, buğday alerjisinin semptomları çok spesifik değildir ve mide bulantısı, kusma, gaz, kramplar, şişkinlik, diyare ve yaygın karın ağrısı içerir (75). Buğday alerjisi altta yatan immünolojik mekanizmaya ve alerjene maruziyet yoluna göre; respiratuar alerji (fırıncı astımı) ve rinit, besin alerjisi, buğdaya bağımlı egzersize bağlı anafilaksi ve kontakt ürtiker olmak üzere 4 alt sınıfa ayrılmaktadır (7).

Fırıncı astımı ya da mesleki astım olarak da bilinen respiratuar alerji, buğday ve tahıl unlarının solunmasına karşı verilen alerjik yanıtla karakterizedir (57, 77). Alfa-amilaz inhibitör ailesinin üyeleri, respiratuar alerjiden sorumlu en önemli alerjenlerdendir (73). Aslında Respiratuar alerjiye sahip hastalar pişmiş buğday ununun yenmesiyle herhangi bir problem yaşamazlar (77). Fakat Salvatori ve arkadaşlarının (78) yaptığı bir çalışmada bazı bireyler buğday ununun kullanıldığı bir mutfakta bulunduğu, fırın veya pizzacıya gittiğinde, pizza veya makarna gibi pişmiş buğday içeren besinleri kokladığında solunum sistemi problemleri yaşadıklarını belirtmişlerdir.

Buğday besin alerjisi, genellikle erken çocukluk döneminde başlar (77). Buğday alerjisine sahip çocukların çoğunda orta şiddetli atopik dermatit ve yumurta ve süt gibi diğer besinlere duyarlılık gözlenir (75, 77). Buğday besin alerjisi, su ve tuzda çözünmeyen, özellikle omega-5 gliadin olmak üzere gliadinlere karşı IgE aracılı bir reaksiyondur (75). Çocuklarda buğday tüketimi, anjioödem, bronş obstrüksiyonu, mide bulantısı ve karın ağrısından anafilaksiye varan ani başlangıçlı IgE aracılı reaksiyonlara kadar çeşitli semptomlara sebep olur. Yetişkinlerde ise buğday tüketimine karşı besin alerjisi nadir görülür (77).

Buğdaya bağımlı egzersize bağlı anafilaksi (Wheat dependent exercise induced anaphylaxis, WDEIA), besin alımına bağlı indüklenen egzersize bağlı anafilaksinin bir alt türü olup, buğday tüketiminin ardından bir ila dört saat içinde egzersiz yapıldığında indüklenen, IgE aracılı aşırı duyarlılık reaksiyonudur (7, 77, 79). Buğday, besin alımıyla indüklenen egzersiz sonrası anafilaksi gelişimine yol açan besinlerden en yaygın olanıdır (77). Aslında tek başına alerjen besinin alımı alerjiyi tetiklemez. Alerjen besinin tüketiminin ardından egzersiz gibi tetikleyici bir kofaktör alerjik semptomların görülmesine neden olur (7). Brockow ve arkadaşları (80) tarafından yapılan bir çalışmada, WDEIA'li hastalarda semptomların tetiklenmesi için buğday tüketiminin ardından egzersizin gerekli olmadığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar aspirin (81), alkol alımı (82) ve menstrual döngü (83) gibi faktörlerin de anafilaksiyi tetiklediğini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada hidrolize buğday proteini içeren kozmetik ürünlerin kullanımının da WDEIA'yi tetiklediği gösterilmiştir (47). Hastalığın semptomları egzersiz sırasında ya da egzersizden sonra ortaya çıkabilir (84). Bu hastalarda, ürtiker, dispne, hipotansiyon, gastrointestinal semptomlar, solunum yolu tıkanıklığı ve anafilaktik şoka varan çeşitli klinik semptomlar gözlenmektedir (7, 77). Buğdaya bağımlı egzersize bağlı anafilaksinin besin alerjisi olduğu, egzersizin ise alerjik semptomları tetikleyen ve şiddetlendiren bir etmen olduğu düşünülmektedir (77). Omega 5-gliadin ve yüksek molekül ağırlıklı glutenin, WDEIA'dan sorumlu ana alerjenler olarak belirlenmiştir (85, 86). Besine bağımlı anafilaksiye duyarlılaşmış bazofillerden ve mast hücrelerinden sistemik mediyatör

salınımının yol açtığı düşünülmektedir. Fakat hastalığın patofizyolojisi henüz kesin olarak bilinmemektedir (4).

Kontakt ürtiker, tepkiye sebep olan bir kimyasal madde veya protein ajanı ile doğrudan temas ettikten sonra ciltte meydana gelen duyarlılık reaksiyonudur (7, 87). Kontakt ürtiker immünolojik ve non-immünolojik olmak üzere iki sınıfa ayrılır. İmmünolojik kontakt ürtiker, IgE aracılı bir duyarlılıktır ve proteinler sebep olur (87). Patogenezi diğer erken aşırı duyarlılık reaksiyonları ile aynıdır ve mast hücrelerinin yüzeyindeki spesifik IgE molekülleri ile antijenlerin birleşmesini içerir (88). Hastanın vücudu, daha önce alerjik ajan ile duyarlı hale gelmiştir. Kontakt ürtikerde, kızarıklık, kabartı, kaşıntı, anjioödem, yaygın ürtiker ve anafilaksi gibi belirtiler görülmektedir (7). En çok etkilenen bölgeler ise eller, kollar ve yüzdür. Teşhisinde genellikle deri prick testleri uygulanır (7). Buğday proteinleri de genellikle meslekle ilişkili olmak üzere kontakt ürtikere sebep olan ajanlar arasındadır. Fırıncılar, değirmenciler ve mutfak personeli etkilenen meslek gruplarından başlıcalarıdır (7).

### **2.6.3. Otoimmün ve Alerjik Olmayan Hastalıklar**

#### **Çölyak Olmayan Gluten Hassasiyeti (NCGS)**

Çölyak olmayan gluten hassasiyetinin (NCGS) resmi olarak tanımlanmış bir tanımı bulunmamaktadır ve literatürde hala tartışılmaktadır(11, 89). Fakat NCGS hastaları, genellikle çölyak hastalığı veya buğday alerjisine dair kesin kanıta sahip olmadıkları halde, gluten içeren besin tüketiminden sonra çeşitli semptomlar geliştiren kişiler olarak tanımlanır (11). Söz konusu semptomlar, kişinin diyetinden gluten çıkarıldığında son bulur fakat yeniden tüketildiğinde semptomlar da yeniden gözlenir (11). Glutenin tüketilmesi ile semptomların görülmesi arasındaki süre bir kaç saat ile bir kaç gün arasında değişir (57). Hastalığın tipik gastrointestinal semptomları; karın ağrısı, abdominal şişkinlik, bağırsak alışkanlığında değişikliklerdir. En sık gözlenen ekstraintestinal semptomlar ise yorgunluk, baş ağrısı, eklem veya kemik ağrısı, duygudurum bozukluklar ve deri bulgularıdır (90). Klinik bulgulardaki benzerlikler ve tanı biyomarkerlerinin bulunmaması sebebiyle NCGS'yi diğer glutenle ilişkili

hastalıklardan ayırmak oldukça güçtür (57). Genellikle çölyak ve buğday alerjisi için yapılan tanı testlerinin olumsuz sonuçlanması üzerine, bir haftalık glutensiz diyet ardından oral gluten yüleme testi yapılarak pozitif sonuç alınmasıyla beraber hastaya NCGS tanısı doğrulanır (57).

NCGS'nin etyolojisi henüz tam olarak bilinmemektedir. Buna rağmen çölyak hastalığında olan adaptif immün markerların aşırı ekspresyonuna rağmen, NCGS'de adaptif immün yanıt olmaksızın doğal immün mekanizmaların etkilendiği düşünülmektedir (90). Aslında NCGS'nin literatürde tanımı, etiyolojisi ve hatta ayrı bir klinik durum olup olmadığı hala tartışılmaktadır. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar NCGS'ye atfedilen abdominal semptomların aslında fermente olabilen oligosakkaritler, disakkaritler, monosakkaritler ve poliyoller (FODMAP) tarafından tetiklendiğini, glutenin NCGS'nin sebebi olmadığını ve NCGS'nin aslında İrritabl Bağırsak Sendromu'nun alt grubu olabileceğini söylemektedir (91, 92).

## **2.7. Gluten ile İlgili Yasal Mevzuat**

Gluten ile ilişkili hastalıklara sahip bireylerde diyetle gluten olması hayati bir problem teşkil etmektedir (93). Sekiz önemli alerjiden biri olan glutenin, gluten içeren tahıllardan çıkarılmasının teknik zorluk ve ekonomik kısıtlamaları veya besin üretim aşamalarında glutensiz besinin gluten kontaminasyona maruz kalması nedeniyle tamamen glutensiz gıdaların üretilmesi oldukça zor olmaktadır (3, 14). Yapılan birçok çalışma piyasadaki doğal olarak glutensiz olan veya glutensiz etiketine sahip besin ürünlerinde gluten kontaminasyonu olduğunu göstermektedir (3, 16, 94-96).

Yapılan araştırmalar çölyak hastalığı veya buğday alerjisi olan bireylerin bir kısmının glutene karşı aşırı duyarlılığı olsa da birçok bireyin, sağlık üzerinde olumsuz etkilere neden olmadan, gıdalardaki glutenin iz miktarlarını tolere edebileceğini göstermektedir (97, 98). Uluslararası kuruluşlar ve ülkeler tarafından bu miktarlar göz önünde bulundurularak besinlerin glutensiz ibaresiyle etiketlenebileceği en yüksek gluten miktarları belirlenmiştir. Glutene tolerans gösteremeyen kişiler için özel olarak formüle edilmiş, işlenmiş veya diyet ihtiyaçlarını karşılamak üzere hazırlanmış özel

beslenme amaçlı gıda maddelerinin “çok düşük gluten” veya “glutensiz” olarak etiketlenmesi Avrupa Komisyonu tarafından bir yönetmelikle düzenlenmiştir. Bu yönetmeliğe göre “çok düşük gluten” ve “glutensiz” olarak etiketlenecek besinlerin gluten içeriği sırasıyla 100 mg / kg ve 20 mg / kg olarak belirlenmiştir (14). Kodeks Alimentarius da Glutene İntoleransı Olan bireyler için Özel Diyet Kullanımı Besin Standardı’nda bir besinin glutensiz olarak etiketlenebilmesi için gluten seviyesinin 20 mg/kg’ı geçemeyeceği belirtilmiştir (8). ABD Gıda ve İlaç İdaresi ise bir ürünün glutensiz olarak etiketlenebilmesi için gluten içeriği üst limitini 20 ppm (mg/L) olarak belirlemiştir (99). Kanada, glutensiz ibaresinin kullanılabilmesi için herhangi bir gluten limiti belirtmemesine rağmen, 20 ppm den daha az gluten içeren besinlerin glutene intoleransı olan bireyler tarafından tüketilmesinin sağlık riski oluşturmayacağı görüşündedir (100). İngiltere de “çok düşük gluten” ve “glutensiz” olarak etiketlenecek besinlerin gluten içeriği sırasıyla 100 ppm ve 20 ppm olarak belirleyen ülkelerden biridir (101). Arjantin ise glutensiz etiketleme konusunda daha sert bir tutuma sahiptir. Arjantin gıda kodeksi glutensiz besinleri 10 mg/kg’ dan daha az gluten içeren besinler olarak tanımlamaktadır (102). Avusturya ve Yeni Zellanda dünyadaki en sert etiketleme yasasına sahiptir. Bunlar Avusturya Yeni Zellanda gıda standartları kanununa göre belirlenmiştir. Bu kanuna göre bir besinin glutensiz olarak tanımlanabilmesi için tespit edilebilir gluten içermemesi gerekmektedir (103).

Ülkemizde de Gıda, Tarım ve Hayvancılık bakanlığı tarafından yayınlanan, Türk Gıda Kodeksi Gluten İntoleransı Olan Bireylere Uygun Gıdalar Tebliği’nde gluten intoleransı olan bireyler için üretilen besinlerin bileşimi ve etiketlenmesinde “Gluten intoleransı olan bireyler için üretilen, gluten seviyesini düşürmek için özel olarak işlenmiş buğday, arpa, yulaf, çavdar veya bunların melez çeşitlerinden elde edilmiş bir veya daha fazla bileşen içeren veya bunlardan oluşan, son tüketiciye sunulacak gıdada gluten miktarı 100 mg/kg’ı aşamaz. Belirtilen ürünlerin etiketlenmesi, reklamı ve tanıtımında “çok düşük glutenli” ibaresi kullanılır. Son tüketiciye sunulacak gıdadaki gluten seviyesinin 20 mg/kg’ı aşmaması koşuluyla “glutensiz” ibaresi kullanılabilir.” ifadesi yer almaktadır (15).

Alerjen kontaminasyonu toplu beslenme yapan kurumlarda da ciddi bir problemdir (104). Glutenle ilgili hastalıklara sahip bireyler için dışarıda yemek yeme önemli bir sağlık riskidir (93). Avrupa Parlamentosu ve Konseyinin yayınladığı “Tüketicilere Yönelik Besin Bilgi Yönetmeliği” ne göre toplu beslenme hizmeti sunan kurumlar nihai tüketiciye yönelik tüm uygulamalarda besin allerjenlerinin riskini yönetmek zorundadır. Hizmet ettikleri bireylere, hazırlanan besinin alerjen bilgisini yazılı veya sözlü bir biçimde vermek mecburiyetindedirler (105).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırma Yeri, Tarihi ve Örneklerin Toplanması

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Beslenme İlkeleri laboratuvarında gerekli izinler alındıktan sonra Kasım ayı 2017 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, randomize tek kör olarak dizayn edilmiştir. Toplu beslenme yapan bir kuruluştaki pastane bölümünde çalışmakta olan profesyonel bir aşçının katılımıyla gerçekleştirilmiş ve örnekler toplanmıştır.

Araştırmanın bütçesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı proje giderleri ödeneğinden karşılanmıştır. Çalışma insan yada hayvan çalışması olmadığı için etik kurul onayı gerektirmemektedir.

#### 3.2. Araştırmanın Planlanması ve Uygulanması

Uygulamanın yapılacağı bölge lazermetre ile ölçülerek toplam alan 97.97 m<sup>2</sup>, hacim ise 345.84 m<sup>3</sup> olarak belirlenmiştir. Ortam koşullarının toplu beslenme hizmeti veren kuruluşlara benzetilmesi için uygulama öncesinde havalandırma açılmıştır.

Çalışmanın akış şeması şekil 3.1'de gösterilmiştir. Glutensiz besinin hazırlanmasında kullanılan mutfak ekipmanları yeni alınmış ve ilk kez kullanılmıştır. Kullanım öncesinde ve aşçı tarafından yapılacak uygulamada kullanılacak mutfak ekipmanları kullanım öncesi standart bir bulaşık deterjanı ve paketinden o anda açılarak ilk kez kullanılan ve tek kullanımlık bulaşık süngeri ile yıkanmıştır. Uygulama yüzeyleri ise önce çamaşır suyu ve daha sonra toplu beslenme yapan kurumlarda sıklıkla kullanılan bir yüzey dezenfektanı (Etkin Maddeleri: *Didesil Dimetil Amonyum Klorür* ve *Polyheksametilen Biguanid Hidroklorür*) ile temizlenmiştir. Uygulama öncesi gluten içermeyen pirinçler haşlanmıştır. Tüm steril petri kaplarına 4.27 g/cm<sup>2</sup> olacak şekilde eşit miktar ve hacimde (50 gram) glutensiz haşlanmış pirinç koyulmuştur.

Uygulama öncesi aynı miktar ve hacimde glutensiz haşlanmış pirinç içeren bir adet petri kabı kontrol örneği olarak kullanılmak üzere kapağı açılarak 30 dk süresince

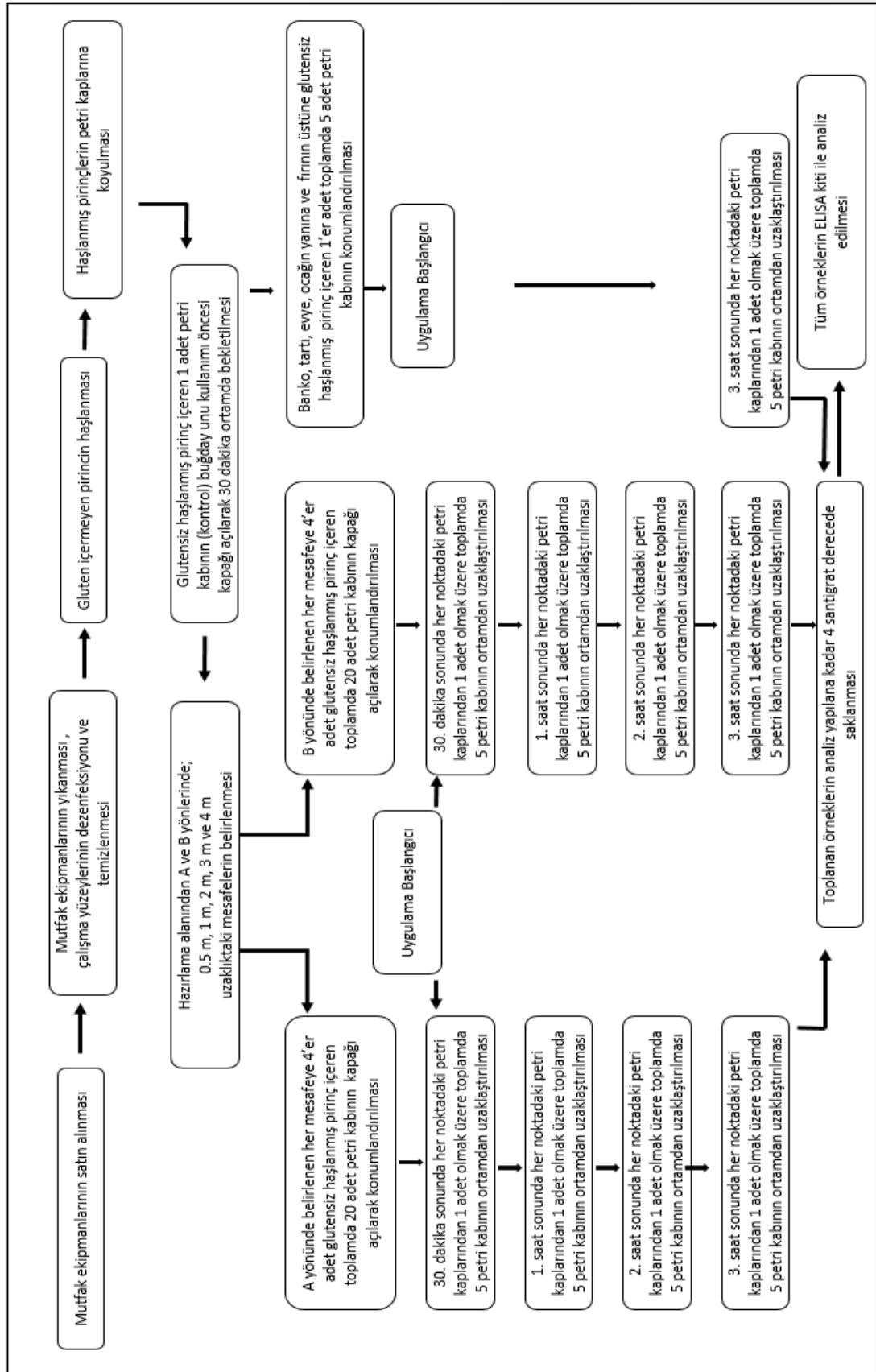
ortamda bekletilmiştir. Daha sonra araştırmacı tarafından petri kabı kapağı kapatılarak streçlenip ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Hazırlama alanı olarak belirlenen noktadan 1.1 metre mesafe uzaklıkta yer alan, mutfağın ortasında bulunan alan, malzeme alanı olarak belirlenmiştir. Hazırlama alanından itibaren yaklaşık olarak 120° açı ile iki farklı yönde (A ve B yönleri) 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 metre uzaktaki mesafeler lazermetre ile ölçülerek belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen her bir noktaya, yerden 1 metre yükseklikte olacak şekilde glutensiz haşlanmış pirinç içeren 4'er adet petri kabı yerleştirilmiştir. Ayrıca aşçının arkasında bulunan hazırlama alanına en yakın mesafedeki bankoya, sıklıkla kullanacağı tartının, el yıkama evyesinin, ocağın yanına ve kullanacağı fırının üstüne de 10 cm'lik mesafe olacak şekilde, gluten içermeyen haşlanmış pirinç içeren petri kapları yerleştirilmiştir (Şekil 3.2).

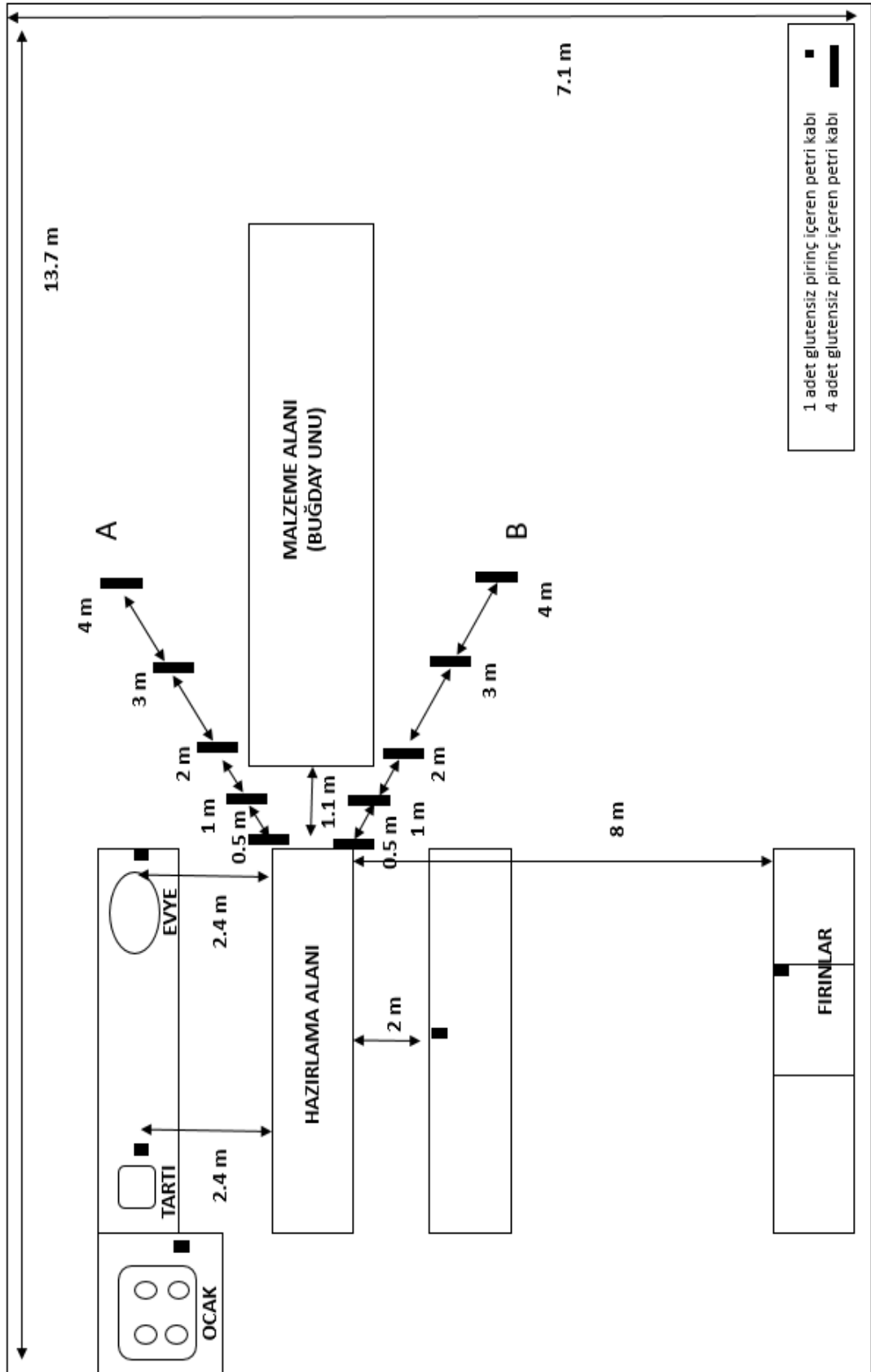
Uygulama toplu beslenme yapan bir kurumda çalışmakta olan bir aşçının katılımıyla tek kör olarak 3 saatlik bir sürede gerçekleştirilmiştir. Aşçıya gluten kontaminasyonu üzerine bir çalışma yapılacağı bilgisi verilmemiştir. Hijyenik ve besin pişirme ilkelerine uygun bir uygulama yapma amacıyla mutfakta olduğu söylenmiştir. Daha sonra aşçıya gramajlar ve hazırlama talimatı içeren standart bir poğaçaya, açma ve börek tarifesi verilmiştir (EK 1). Tarifelerin malzemeleri kullanım için malzeme alanına yerleştirilmiştir. Aşçıdan malzemeleri, malzeme alanından alıp hazırlama alanını kullanarak talimatlara uygun bir şekilde uygulamayı gerçekleştirmesi istenmiştir. Aşçı uygulama esnasında laboratuvarda bulunan kamera ile uygulama süresince izlenmiştir. Uygulamada 3 kg buğday unu kullanılmıştır. A ve B yönlerinde konumlandırılan glutensiz haşlanmış pirinç içeren petri kaplarının kapakları açılmıştır. Uygulama başlama saati 0 kabul edilip 30. dakika, 1., 2. ve 3. saatlerde A ve B yönlerinde bulunan petri kaplarından birer tane araştırmacı tarafından alınarak kapatılıp streçlenerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Banko, tartı, el yıkama evyesi, ocak ve fırının yanındaki yerleştirilen petri kapları ise uygulama sonunda kapatılarak streçlenip ortamdan uzaklaştırılmıştır.



Uygulamadan sonra alınan petri kapları analiz yapılana kadar 4 santigrat derecede muhafaza edilmiştir. Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay (ELISA) test kiti yardımıyla analiz edilerek besinlerdeki gluten miktarları belirlenmiştir. Analizler duplike şekilde yapılmıştır.



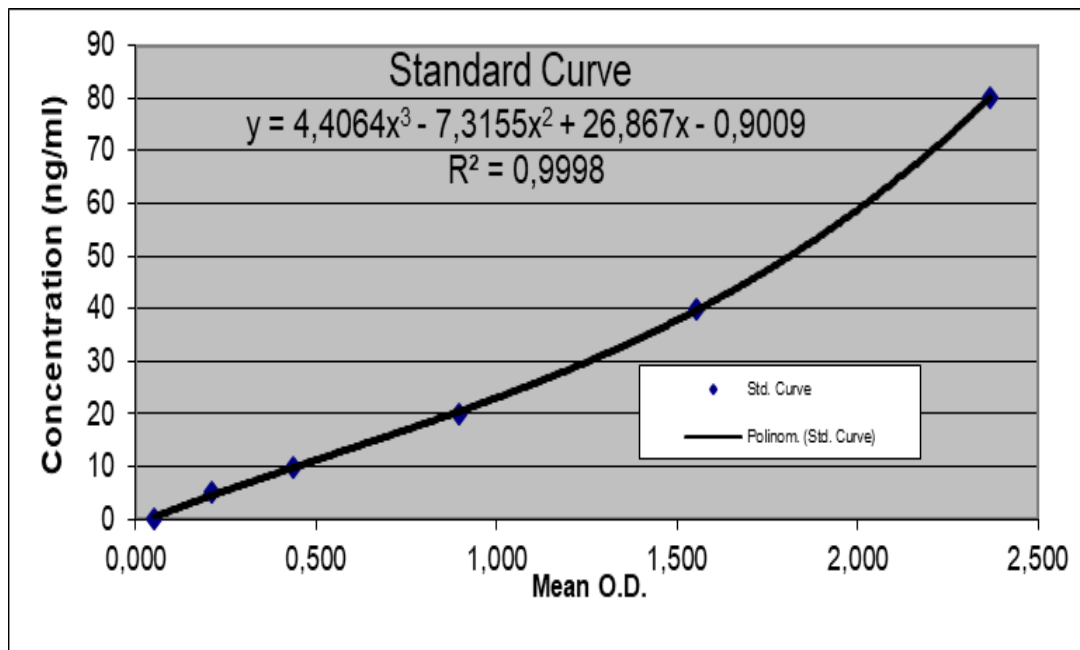
Şekil 3.1. Uygulama akış şeması.



Şekil 3.2. Uygulamanın yapıldığı mutfak planı.

### 3.3.Yöntem

Glutensiz besin örneklerindeki gluten bulaşı düzeyleri, Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Orhan Köksal Araştırma laboratuvarında antijen-antikor reaksiyonlarının saptandığı bir enzim immunoassay yöntemi olan ELISA gluten kiti kullanılarak belirlenmiştir. Glutensiz besinlerdeki gluten bulaş düzeyleri, ELISA kiti (ALLER-TEK™ Gluten ELISA, USA) ile üretici firma tarafından belirlenen protokole göre çalışılmıştır (EK 2). Daha sonra standartların absorban değerleri kullanılarak standart eğri elde edilmiştir ve analiz edilen glutensiz besin örneklerindeki gluten bulaş düzeyleri hesaplanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. ELISA standart eğri grafiği.

### 3.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde; IBM SPSS Statistics 23.0 (Statistical for Package for Social Science) programından yararlanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak besin örneklerinin gluten düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. Çalışma örneklerin, kontrol örneğinden gluten bulaş düzeyi açısından farklı olup olmadığını test etmek için One Sample T testi uygulanmıştır. Gluten bulaş

düzeyine mesafenin ve maruziyet süresinin etkisinin test edilmesi için ise Genelleştirilmiş Lineer Karma Model kullanılmıştır. Bu çalışmada yapılan analizlerde p değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Çalışma sonucunda buğday unu kullanım alanından A ve B yönlerinde 0,5 m , 1 m, 2 m, 3 m ve 4 m uzaklık mesafelerinde konumlandırılmış ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 3 saat sonunda ikişer adeti toplanmış olan, toplamda her bir konumda sekizer adet olacak şekilde 40 glutensiz haşlanmış pirinç örneği toplanmıştır. Ayrıca ocak, tartı, banko, fırın ve el yıkama evyesinin yakınına konumlandırılmış ve buğday unu kullanım işlemi boyunca kapakları açık bir şekilde bekletilen glutensiz haşlanmış pirinç içeren 5 adet petri kabına ek olarak buğday unu kullanım işlemi öncesi ortamda 30 dakika kapağı açık bir şekilde bekletilen glutensiz haşlanmış pirinç içeren bir adet petri kabı (kontrol örneği) toplanmıştır.

Toplanan ve analiz edilen toplamda 46 örneğin tamamında gluten kontaminasyon düzeyi 20 ppm'in altında tespit edilmiştir.

Tablo 4.1.'de glutensiz besin örneklerinin buğday unu kullanım alanına olan mesafelerine göre; Tablo 4.2.'de ise glutensiz besin örneklerinin, buğday unu kullanımına maruz kalma süresine göre ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Buğday unu kullanım alanına çeşitli mesafelerde yer alan glutensiz besin örneklerinin gluten düzeylerine göre kontrol örneği ile karşılaştırılması.

Mesafe (Metre)	Sayı	X±SS	*p	Ortalama Fark	Gluten Konsantrasyonları (ppm)	
					%95 Güven Aralığı	
					Alt Değer	Üst Değer
0,5	8	0,57 ±0,23	<b>0,020</b>	0,24	0,05	0,43
1	8	0,42 ±0,08	<b>0,019</b>	0,09	0,02	0,16
2	8	0,44±0,07	<b>0,004</b>	0,11	0,05	0,16
3	8	0,44±0,06	<b>0,001</b>	0,11	0,06	0,16
4	8	0,49±0,15	<b>0,021</b>	0,16	0,03	0,29

\*One Sample T Testi uygulanmıştır. Test Değeri (Kontrol Örneği) = 0,33 ppm olarak alınmıştır.

Buğday unu kullanımı başlamadan önce ortamda kapağı açılarak 30 dakika bekletilen kontrol örneğinin bekleme saatine göre gluten düzeyinin artmadığı varsayılarak gluten düzeyi açısından diğer örneklerle kıyaslama yapılmıştır. Tablo 4.1.'de gösterildiği gibi artan mesafelerde konumlandırılan tüm örneklerin gluten kontaminasyon düzeyi kontrol örneğinin gluten düzeyi olan 0,33 ppm'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

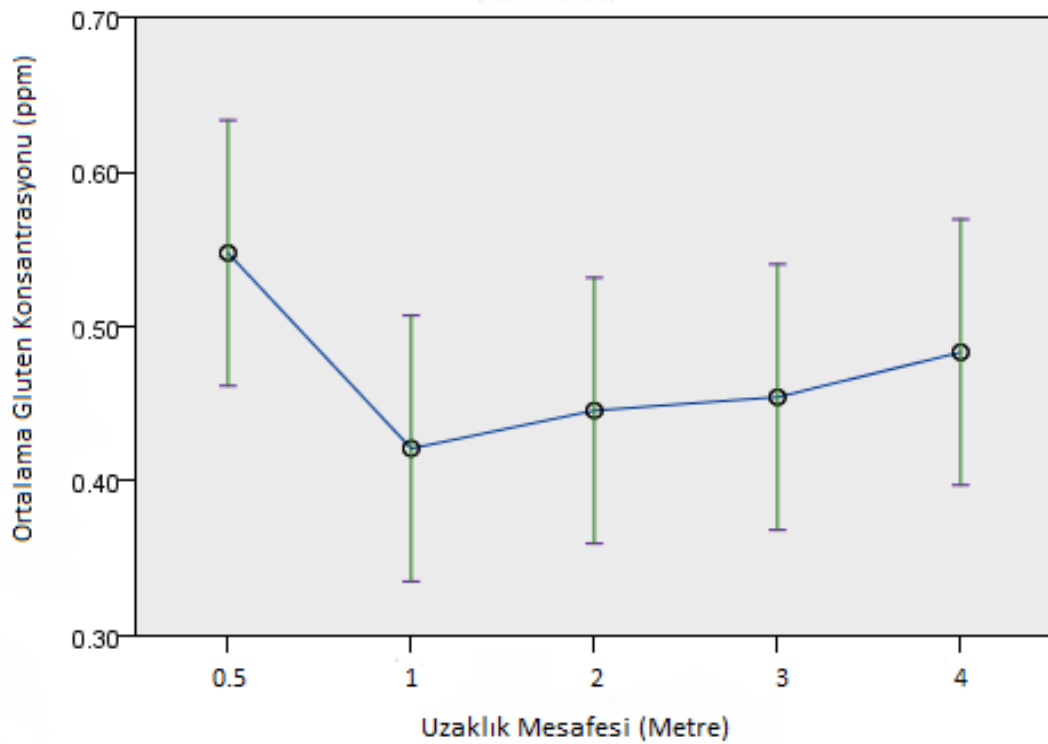
**Tablo 4.2.** Buğday unu kullanıma artan sürelerde maruz kalan glutensiz besin örneklerinin gluten düzeylerine göre kontrol örneği ile karşılaştırılması.

Maruziyet Süresi (Saat)	Sayı	X±SS	*p	Ortalama Fark	Gluten Konsantrasyonları (ppm)	
					%95 Güven Aralığı	
					Alt Değer	Üst Değer
0,5	10	0,45±0,12	<b>0,011</b>	0,12	0,03	0,20
1	10	0,50±0,21	<b>0,034</b>	0,17	0,02	0,32
2	10	0,47±0,13	<b>0,008</b>	0,14	0,05	0,24
3	10	0,47±0,08	<b>&lt;0,001</b>	0,14	0,08	0,20

\*One Sample T Testi uygulanmıştır. Test Değeri (Kontrol Örneği) = 0,33 ppm olarak alınmıştır.

Tablo 4.2.'de gösterildiği gibi buğday unu kullanımına artan sürelerde maruz kalan tüm örneklerin gluten kontaminasyon düzeyi kontrol örneğinin gluten düzeyi olan 0,33 ppm'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

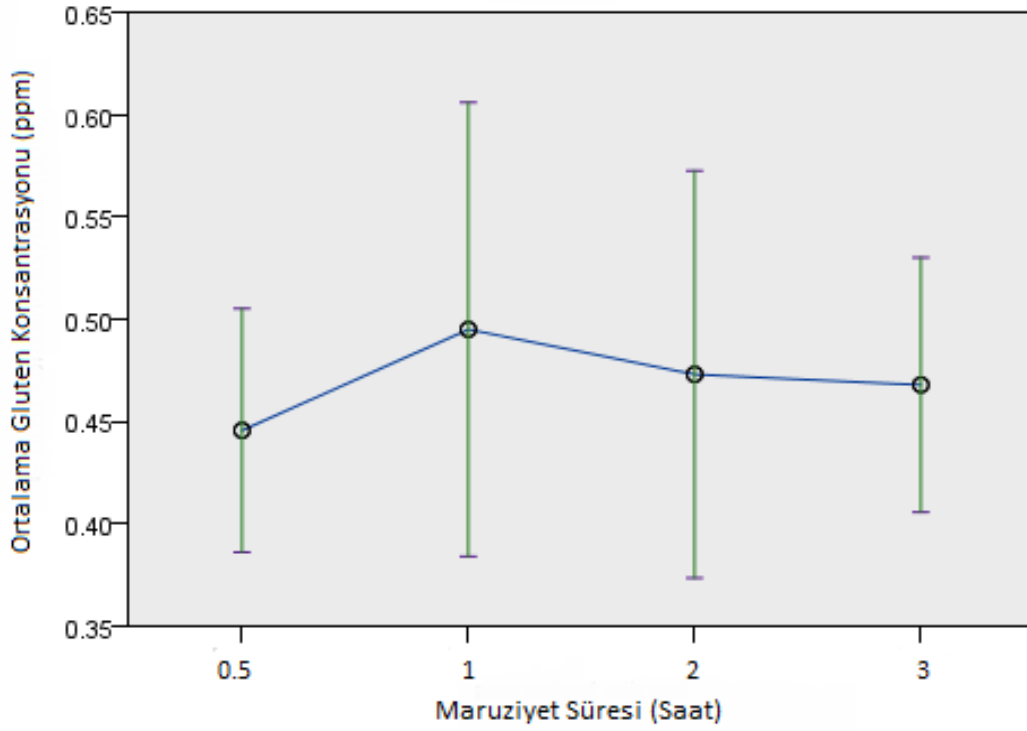
Şekil 4.1.'de yapılan genelleştirilmiş lineer karma modele göre glutensiz besinlerde meydana gelen gluten kontaminasyon düzeylerinin buğday unu kullanım alanı uzaklık mesafesine göre karşılaştırılmasında bulaşın en fazla 0,5 metre mesafede olduğu fakat gluten bulaş düzeyine mesafenin istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmektedir ( $p=0,252$ ).



**Şekil 4. 1.** Buğday unu kullanım alanından artan mesafelerde konumlandırılmış glutensiz besin örneklerinin ortalama gluten konsantrasyonları

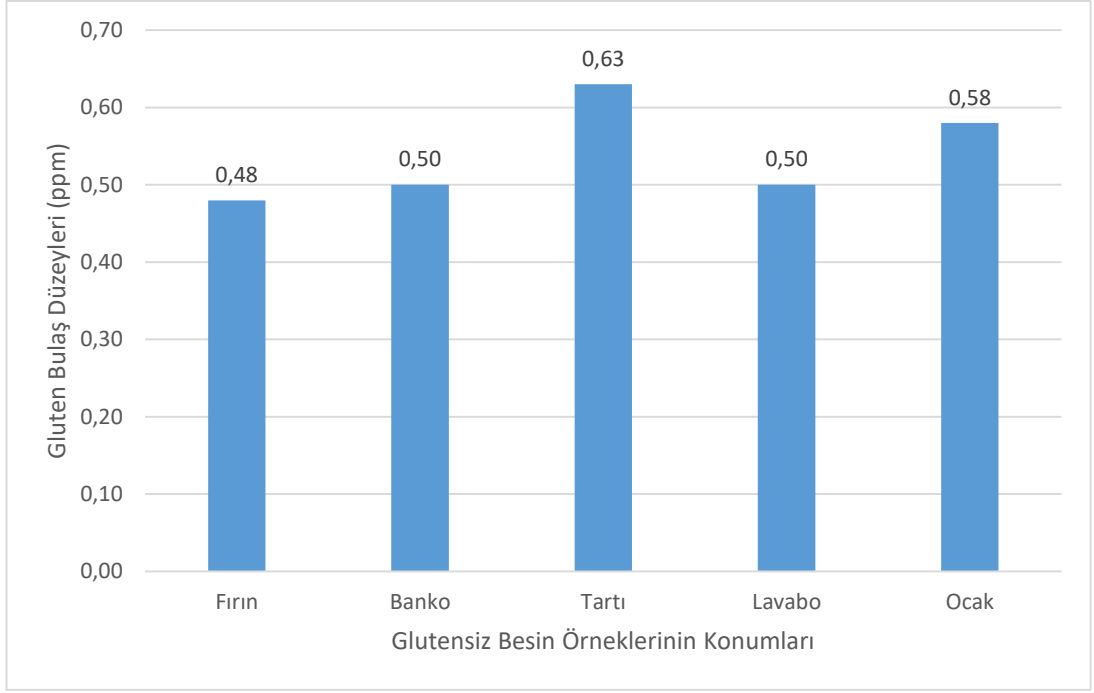
Şekil 4.2.'de ise yapılan geliştirilmiş karma lineer modele göre glutensiz besinlerde meydana gelen gluten kontaminasyon düzeyinin en fazla ilk bir saatte olduğu sonraki saatlerde değişkenlik olmadığı, bununla birlikte gluten bulaş düzeyine, buğday ununa maruz kalma süresinin istatistiksel olarak ise anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmektedir ( $p=0,856$ ).





**Şekil 4.2.** Buğday unu kullanımına artan sürelerde maruz kalan glutensiz besin örneklerinin ortalama gluten konsantrasyonları

Aşçının arkasında bulunan hazırlama alanına en yakın mesafedeki bankonun, sıklıkla kullandığı tartının, el yıkama eyesinin, ocağın yanına ve kullanacağı fırının üstüne 10 cm'lik mesafe olacak şekilde konumlandırılan glutensiz besin içeren örneklerin gluten bulaş düzeyleri Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. En yüksek gluten çapraz bulaşın, tüm malzemelerin ölçümünün yapıldığı tartı yakınındaki (10 cm) örnekte meydana geldiği görülmüştür.



**Şekil 4.3.** Konumlandırıldığı yere göre glutensiz besin örneklerinin gluten bulaş düzeyleri.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma; toplu beslenme yapan bir kurumda gluten içeren unlu besin hazırlanırken hazırlama alanında ve hazırlama alanındaki glutensiz ürünlerde çapraz bulaş nedeni ile oluşabilecek gluten kontaminasyonu düzeyini ve kontaminasyonu engellemek için glutensiz besinin buğday unu hazırlama alanı ile arasında bulunması gereken en uygun minimum uzaklık mesafesini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bununla birlikte gluten içeren unlu besinleri hazırlama süresi ile aynı ortamdaki glutensiz besinlerde meydana gelen gluten kontaminasyonu düzeyi arasındaki ilişkiyi belirlemek amaçlanmıştır.

Glutensiz besinlerde gluten kontaminasyonu kaçınılmazdır ve tespiti için çok hassas analitik araçlar gerekmektedir (106). Bu sebeple günümüze kadar besinlerdeki glutenin tespiti için Western Blot ve Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay (ELISA) gibi immünolojik, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi genomik ve Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) gibi proteomik yöntemler kullanılmıştır. Bunlara ek olarak Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) ve Yüksek Performanslı Kapiler Elektforez (HPCE) gibi kromatografik temelli; İzolelektrik Odaklama, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE) ve Asit Poliakrilamid jel elektforezi (A-PAGE) gibi elektforetik temelli yöntemler de besinlerde gluten tespiti için kullanılan yöntemler arasındadır (107-109). Kütle spektrometresi (MS), besinlerdeki proteinlerin ve peptitlerin belirlenmesi, tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan hassas bir yöntemdir. Bu yöntem moleküllerin iyonizasyonuna dayanır. Proteomik yöntemlerin kullanımı, glutenin diğer proteinlere kıyasla düşük miktarda bulunduğu besinlerde oldukça zordur (107). Çeşitli MS teknikleri bulunmaktadır. Toksik prolaminlerin belirlenmesinde kullanılan ilk immünolojik olmayan teknik MALDI-TOF MS'dir. Fakat bu yöntem parçalanmamış glutenlerin analizinde, dizilimlerinin benzer olması sebebiyle yetersiz olmaktadır (107). Ayrıca 20-25 mg/kg'ın altındaki prolamin düzeylerini tespit edememektedir (110). Kromatografik yöntemler ise unlardaki gluten tespiti için yeterli olsa da, düşük seçicilik ve duyarlılık nedeniyle kompleks besin

matrislerinde glutenin tespitinde başarılı olamamaktadır (109). Genomik yöntemler ise gluten proteinini değil gluten varlığını gösteren DNA ve RNA'yı hedef almaktadır (109). Polimeraz Zincir Reaksiyonu, ELISA yöntemine göre daha hassas bir yöntem olarak önerilmesine rağmen DNA bozunumundan dolayı buralar, şuruplar, malt özleri ve işlenmiş besinlerde glutenin tespiti için uygun olmadığı belirtilmektedir. Elektroforez yöntemler ise besinlerde glutenin tespitinde yeterince hassas değildir (109).

Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay ise immünolojik tabanlı bir yöntemdir ve gluten tayini için en sık kullanılan yöntemler arasındadır (109). Toksik gluten epitoplarını tespit etmenin bir yolu olan ELISA, besinde bulunan immunotoksik peptidlere özgü monoklonal antikoları kullanan bir yöntemdir (106). Çeşitli gluten veya gliadin antikoları geliştirilmesine rağmen piyasada bulunan ELISA test kitlerinin çoğu, Skerritt (401,21), R5, G12 ve  $\alpha$ 20 monoklonal antikor (mAb) tabanlıdır (109). Skerritt mAb tabanlı ELISA, Uluslararası Resmi Analitik Kimyagerler Birliği (AOAC) tarafından Resmi Metot 991,19 olarak kabul edilmiştir (111). Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay yöntemi, hassas, spesifik, hızlı sonuç verebilen, kolay, tekrarlanabilir ve 20 mg/kg'ın altındaki gluten düzeylerini tatmin edici düzeyde tespit edebilmenin yanı sıra ileri laboratuvar ekipmanı gerektirmeyen bir yöntem olduğu için gluten deteksiyonunda sıklıkla tercih edilmektedir (106, 109). Bu sebeple bu çalışmada da gluten kontaminasyon düzeylerini belirlemek için Skerritt mAb tabanlı sandviç ELISA yöntemi tercih edilmiştir.

Besinlerdeki gizli alerjenler, hassasiyete sahip bireyler için hayati bir önem teşkil etmektedir. Yapılan bir çalışmada besin alerji vakalarının yaklaşık dörtte birine, besinlerdeki gizli alerjenlerin sebep olduğu görülmüştür. Bu vakaların % 32'sinin ise anafilaktik reaksiyon olduğu bildirilmektedir. Bu alerjik reaksiyonların daha çok besinlerde meydana gelen alerjen kontaminasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (41).

Kodeks Alimentarius ve Avrupa Komisyonu gibi kuruluşlar tarafından ve Türk Gıda Kodeksi Gluten İntoleransı Olan Bireylere Uygun Gıdalar Tebliğinde belirtildiği

üzere bir besinin glutensiz olarak etiketlenebilmesi için gluten seviyesinin 20 mg/kg'ı geçmemesi gerekmektedir (8, 14, 15). Yapılan çalışmalar dünya piyasasında yer alan ve glutensiz olarak etiketlenmiş ürünlerin bir kısmının gluten düzeylerinin belirlenen yasal limitlerin üzerinde olduğunu göstermektedir (94, 112-116). Kanada'da yapılan bir çalışmada toplanan 77 "glutensiz" etiketine sahip ürünün % 9'unda yasal limitlerin üzerinde gluten düzeyi belirlenmiştir (113). Hassan ve arkadaşlarının (114) Lübnan'daki "glutensiz" etiketine sahip besinlerin gluten kontaminasyonu düzeyini belirlemek için yaptıkları bir çalışmada 2 yıl süreyle 173 glutensiz etiketli besin örnekleri toplanmıştır. Yapılan analizlerde 173 örneğin 10'unda (% 6) kontaminasyon varlığı (gluten konsantrasyonu >20 ppm) gözlenmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde piyasadaki "glutensiz" etiketli ürünlerde yapılan bir çalışmada 275 "glutensiz" etiketli üründen %1,1' inde 20 ppm'in üzerinde gluten tespit edilmiştir (115). İtalya'da yapılan bir çalışmada ise, "glutensiz" olarak etiketlenmiş 93, "glutensiz" etiketine sahip olmayan fakat doğal olarak glutensiz olan 107 örnek olmak üzere toplamda 200 örnek rastgele toplanmıştır. Yapılan analizlerde "glutensiz" etiketine sahip örneklerin %1'inde, doğal olarak glutensiz olan örneklerin ise %8'inde gluten düzeyi 20 ppm'in üzerinde tespit edilmiştir (116). Yasal limitlerin üzerinde gluten düzeyine sahip ürünlerin besin zincirinin herhangi bir aşamasında gluten kontaminasyonuna uğradığı ve bu sebeple "glutensiz" etiketleriyle uyumlu olmadıkları görülmektedir.

Doğal olarak glutensiz besinlerin çapraz kontaminasyona uğraması, besin zincirinin her aşamasında, yetiştirilmelerinde, hasat edilmesinde, depolanmasında veya işlenmesinde meydana gelebilmektedir. Besin üreticileri, gluten içeren besinleri ve glutensiz besinleri üretmek için ortak ekipman ve tesisler kullanabilmektedir. Bu da glutensiz besinin, gluten içeren bir besine dönüşmesine sebep olmaktadır (112). Thomphon ve arkadaşlarının (117) yaptığı çalışmada doğal olarak gluten içermeyen 22 tohum, tahıl ve un örneği gluten düzeylerini tespit etmek için analiz edildiğinde örneklerin %32'sinin 20 ppm'den daha yüksek gluten düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir. Kanada'da satılan doğal olarak gluten içermeyen un ve nişastalardan satın alınan örnekler gluten kontaminasyonu açısından analiz edildiğinde ise "glutensiz" etiketine sahip 268 örneğin %1,1 'i, "glutensiz" etiketine sahip olmayan

298 örneğin ise %10,1 'inin gluten kontaminasyonuna uğradığı (gluten düzeyleri>20 ppm) bildirilmiştir (95). Størsrud ve arkadaşlarının (118) İsveç'te yaptığı çalışmada ise doğal olarak gluten içermeyen 22 örneğin % 41'inde; 88 yulaf ürününün ise %50'sinde 20 ppm üzerinde gluten tespit edilmiştir.

Glutensiz diyet yapan bireylerin çavdar, arpa gibi taksonomik olarak buğdaya benzer türlerden de kaçınması gerekmektedir (119). Fakat yulafdaki prolaminler, daha az miktarda prolin içerdiği için ve depo proteini daha az olduğu için diğer tahıl prolaminlerinden farklıdır (53). Bu sebeple yulafın çölyak hastası bireylerde güvenli kullanımı hala tartışmalıdır. Fakat son yıllarda bir miktar saf yulafın, çölyak hastası bireylerin büyük çoğunluğu tarafından tolere edilebildiği gösterilmektedir (56). Koerner ve arkadaşları (3) tarafından Kanada'da yapılan çalışmada, piyasadan iki farklı zamanda toplanan yulaf numunelerinin % 88'inde 20 ppm'in üzerinde gluten tespit edilmiştir. İtalya'da piyasadan toplanan 5 yulaf örneğinden 4'ünün gluten kontaminasyonuna uğradığı belirlenmiştir (116). Yapılan çalışmalar yulafın çoğunlukla gluten içeren diğer tahıllarla kirlendiğini bildirmektedir. Yulaf örneklerindeki gluten kontaminasyonlarının; tarlada, ürünlerin depolanması, işlenmesi ve paketlenmesi gibi aşamalarında gluten içeren tahıllardan meydana gelen çapraz bulaştan kaynaklı olabileceğini vurgulanmaktadır (3, 116).

Glutensiz ürün satan fırınlar, buğday unu kullanım yoğunluğu göz önünde alındığında, glutensiz ürünler hazırlanırken glutenin çapraz kontaminasyonu için oldukça tehlikeli alanlardır (16). Farage ve arkadaşların (16) Brezilya' da yaptıkları bir çalışmada; üç farklı günde üç farklı zamanda, glutensiz ürün satan fırınlardan glutensiz ekmek, bisküvi ve kek çeşitleri olmak üzere ürün örnekleri toplanmıştır. Toplamda analiz edilen 130 örneğin % 21,5'inde 20 ppm'in üzerinde gluten tespit edilmiştir. Ürün gruplarına göre bakıldığında ise en yüksek gluten kontaminasyonun kek ürünlerinde meydana geldiği gözlenirken (% 66,7), daha sonra bu sonucu bisküvilerin (%31,8) izlediği görülmektedir. Ayrıca bu çalışmada örneklerin toplandığı fırınların % 64'ünün en az bir tane gluten ile kontamine olmuş ürün sattığı görülmüştür (16). Fırın çalışma ortamı göz önünde bulundurulduğunda, çapraz bulaş nedeniyle buğday unundan glutensiz ürünlere gluten kontaminasyonu olma ihtimalini yüksektir. Bu

sebeple glutensiz fırıncılık ürünlerinde tespit edilen gluten düzeyleri beklenmesine rağmen endişe verici bir sonuçtur (16).

Toplu beslenme hizmeti veren kuruluşlarda gluten hassasiyetine sahip tüketiciler içerik bilgisine ulaşamamaktadır. Bu tüketiciler için toplu beslenme hizmeti almak oldukça riskli ve zor olabilmektedir (35). Bu hizmeti alırken farkında olmadan alerjene maruz kalabilmektedirler. Toplu beslenme yapan kurumlar çapraz kontaminasyon nedeniyle alerjik reaksiyonların sıklıkla gözleendiği yerler arasındadır. Çoğu ölümlerle sonuçlanan besin alerjisi reaksiyonlarının büyük bir kısmının restoranlarda hazırlanan yemeklerden dolayı meydana geldiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (39, 40). Besin alerjisiyle ilişkili anafilaksiye bağlı ölümlerle sonuçlanan 32 vakanın incelendiği bir çalışmada vakaların yaklaşık % 75'inin ev dışında, toplu beslenme hizmeti veren kurumlarda meydana geldiği belirtilmiştir (39). Eigenmann ve arkadaşlarının (120) internet üzerinden yaptığı bir anket çalışmasında ise besin alerjisine maruz kalan 51 bireyin % 17,6'sı restoranlarda, % 15,7'si okullarda, % 3,9'u hastanelerde verilen toplu beslenme hizmeti sırasında alerjene maruz kaldığını belirtmiştir. Alerjik vakaların % 21,1'inin ise besinin pişirilmesi sırasında meydana gelen alerjen kontaminasyondan kaynaklandığı bildirilmiştir. Özellikle besin hazırlama alanının kısıtlı olduğu, özel donanımların olmadığı, alan ve ekipman paylaşımının olduğu mutfaklarda çapraz kontaminasyon meydana gelebilmektedir (35). Fritözlerde ve ızgaralarda ortak kullanılan yağlar, alerjen bileşen içeren besinleri hazırlamak için aynı çalışma yüzeyleri ve fritöz, ızgara, mikser, tava gibi ortak mutfak ekipmanlarının kullanılması toplu beslenme sistemlerinde meydana gelen çapraz kontaminasyonun başlıca sebeplerindendir (35, 36, 40). Yapılan bir çalışmada toplu beslenme hizmeti alırken meydana gelen 106 alerjik vakanın % 22'sinde, besinin hazırlanmasında kullanılan ortak ekipman ve servis malzemelerinden meydana gelen çapraz kontaminasyondan kaynaklı maruziyet olduğu bildirilmiştir (40).

Toplu beslenme yapan kurumlarda çalışan personelin besin alerjileri ile ilgili bilgi düzeyleri de besinler hazırlanırken çapraz kontaminasyon meydana gelmesindeki en önemli faktörlerden birisidir. Bu sebeple besin alerjisine sahip bireylere yemek hazırlayacak personelin eğitimi önemlidir. Yapılan çalışmalar toplu

beslenme yapan kurum personellerinin alerjenler konusunda yeterli bilgiye sahip olmadıklarını göstermektedir (121-124). Kafe ve restoran işletmecilerinin alerjen bilgi düzeyini ölçmek için yapılan bir çalışmada ankete katılan 124 işletmecinin % 20'si çapraz kontaminasyon riski olmadığını düşündüğü için açık büfe servisini alerjen müşteriler için güvenli bulduğunu belirtmiştir. Katılımcıların % 18'i yemeye hazır yemek içerisinden alerjen besinin çıkarılmasıyla yemeğin alerjen müşteri için güvenli hale geleceğini, % 7'si ise küçük miktarlardaki alerjen besinin, alerjiye sahip müşteri tarafından tüketilmesinin güvenli olduğunu belirtmiştir (125). Brezilya'da çölyak hastaları tarafından sıklıkla tüketilen ve tarifesinde gluten içermeyen bir besin olan fasulye yemeğinin, self servis restoranlarda servise sunulan örneklerinde gluten kontaminasyonunu değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada ise, 20 restorandan toplanan fasulye örnekleri analiz edilmiş ve örneklerin %16'sının gluten ile kontamine olduğunu ve 20 ppm'in üzerinde gluten düzeyine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca örneklerin toplandığı restoranların %45'inde gluten kontaminasyonuna uğramış en az bir örnek olduğu vurgulanmaktadır. Bu kontaminasyonun gıda servisi veren restoranların neredeyse yarısında olduğu anlamına gelmektedir. Çalışmada bu durumun aşçıların glutenle ilişkili hastalıklara dair bilgi eksikliklerinden kaynaklanan ve gluten içermemesi gereken bu yemeğin yapılırken, yoğunlaştırmak amacıyla buğday unu kullanımı veya baharatların kullanımından kaynaklandığı belirtilmektedir (126). Bu da gluten hassasiyetine sahip bireyler için istemsiz gluten alımına sebep olmaktadır. Bu durum endişe vericidir. Çünkü 8 majör alerjen (yerfıstığı, kabuklu kuruyemişler, süt, yumurta, balık, kabuklu deniz ürünleri, soya ve buğday) alerjik reaksiyonların % 90'ından sorumludur (127). Bu sebeple besin hizmet sektöründe çalışan bireylerin bu konuda bilgi sahibi olmaları alerjen bireyler için kritik bir öneme sahiptir.

Buğday unu içeren besinler hazırlanırken aynı anda, aynı mutfakta glutensiz besinlerin hazırlanıp hazırlanamayacağı hem besin üreticiler tarafından hem de gluten hassasiyetine sahip bireyler tarafından oldukça merak edilmektedir. Fakat literatürde bu konuda yapılan çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır.



Yapılan bu çalışmada buğday unu içeren besin hazırlanması esnasında aynı mutfakta bulunan artan mesafelerde konumlandırılan glutensiz besinlere, buğday unundan gluten kontaminasyonu meydana geldiği tespit edilmiştir. Her bir mesafedeki örneklerin gluten düzeyleri, kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Ayrıca artan sürelerde buğday kullanımına maruz kalan örneklerin gluten kontaminasyon düzeyleri ile kontrol örneğinin bekleme saatine göre gluten düzeyinin artmadığı varsayılarak karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Ancak yapılan analiz sonucunda glutensiz besinlerde gerçekleşen kontaminasyon düzeyinin tüm örnekler için uluslararası kuruluşlarca ve ülkemizce belirlenen yasal limitin (20 ppm) altında olduğu gözlenmiştir. Çalışmada glutensiz besinlerde meydana gelen gluten kontaminasyon düzeyine, buğday unu kullanım alanına olan uzaklık mesafesinin ( $p > 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Miller ve arkadaşlarının (128) yaptığı benzer bir çalışmada, ticari mutfaklarda buğday unu kullanımı sırasında glutensiz yemekler üretilirken gluten bulaşını etkileyen etmenler araştırılmıştır. Yapılan çalışmada buğday unu kullanım alanının glutensiz besine olan mesafesi ile gluten kontaminasyonu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Gluten kontaminasyon düzeyinin, glutensiz besinin buğday kullanım alanına olan mesafesi arttıkça azaldığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda ayrıca glutensiz besinlerin buğday unu kullanımına maruziyet süresinin ( $p > 0,05$ ) glutensiz besinlerde meydana gelecek gluten bulaşına istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Miller ve arkadaşlarının (128) yaptığı çalışmada ise glutensiz besinlerin buğday unu kullanımına maruziyet süresi ile buğday unu kullanım alanına olan mesafe arasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Çalışmamızın sonuçları diğer çalışmanın sonuçları ile uyumlu bulunmamıştır. Uygulamanın yapıldığı laboratuvarın alanının toplu beslenme sistemlerinde pastane alanlarından daha büyük olması ve örnek sayımızın daha az olması sonuçlarımızdaki farklılığın etmenlerinden birisi olarak düşünülmektedir.

Ayrıca çalışmalarda kullanılan un miktarlarının farklı olmasının glutensiz besinlerde meydana gelen gluten bulaşının farklı olmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Miller ve arkadaşları (128) çalışmalarında, buğday unu kullanım alanı ile glutensiz besinler arasına bir bariyer konumlandırılarak, örneklerin gluten kontaminasyon düzeylerini araştırmışlardır. Aralarında bariyer olan örneklerde daha düşük gluten kontaminasyonu tespit edilmekle beraber bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Ayrıca buğday ununa uzun maruziyet süresinde bariyer kullanımının daha önemli olduğu bildirilmiştir. Buğday unu kullanımı esnasında mutfakta havalandırmanın açık olup olmamasının ise gluten kontaminasyon seviyesinde önemli bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir ( $p > 0,05$ ). Çalışma sonucunda gluten kontaminasyon düzeyini 20 ppm'in altında tutabilmek için minimum uzaklık mesafesinin 2 m olması gerektiği belirtilmiştir (128).

Yaptığımız bu çalışmada, buğday unu kullanım öncesi aşçının arkasında bulunan hazırlama alanına en yakın mesafedeki bankonun, sıklıkla kullandığı tartının, el yıkama evyesinin, ocağın yanına ve kullanacağı fırının üstüne 10 cm'lik mesafe olacak şekilde konumlandırılan glutensiz besin içeren örneklerin uygulama sonunda gluten bulaş düzeyleri analiz edildiğinde en yüksek bulaşın tartı yakınına konumlandırılan örnekte gerçekleştiği, en az bulaşın ise fırın üzerinde bulunan örnekte gerçekleştiği belirlenmiştir. Bulaş her ne kadar yasal sınırın altında kalsa da, kontaminasyon düzeyinin işlem yapılan alana yaklaştıkça arttığı görülmüştür. Bu da çapraz bulaşın asıl hazırlama alanlarına yakın yerlerde gerçekleştiğini göstermektedir.

Glutenle ilişkili hastalıklara sahip bireyler, tükettikleri gluten miktarlarına farklı düzeyde yanıt vermektedir. Çölyak hastaları için önemli olan günlük toplam gluten alım miktarı iken, buğday alerjilerinde tek seferde maruz kalınan gluten miktarı önemlidir (129). Bireyler aynı hastalığa sahip olsalar bile glutene karşı gösterdikleri hassasiyet bireyler arası çeşitlilik göstermektedir (7). Buğday alerjisine sahip bazı bireylerde buğday ununun kullanıldığı mutfakta bulunma ya da pişmiş buğday içeren besinleri koklama ile dahi alerjik reaksiyonların tetiklendiğine dair vakalar mevcuttur (78). Bu nedenle çalışmamızda elde edilen gluten bulaş düzeyleri 20 ppm 'in altında

olmasına rağmen, tespit edilen düzeyler çölyak hastalarında günlük maksimum gluten alım düzeyine katkıda bulunarak hastalar için risk oluşturmaktadır. Ayrıca tespit edilen bu düzeyler buğday alerjisine sahip bazı bireylerde alerjik reaksiyonları tetikleyebilir.

Çalışmanın kısıtlayıcı etmenleri arasında en önemlisi, sonuçların karşılaştırılması için benzer çalışmaların bulunmamasıdır. Bir diğer kısıtlayıcı etmen ise uygulamanın toplu beslenme hizmeti veren bir kurum mutfağında değil Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Beslenme İlkeleri Laboratuvarında ve yalnızca bir aşçı ile gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bu durum gerçek bir kurum mutfağında olan fakat uygulamanın gerçekleştirildiği alanda olmayan; aşçıların ve diğer mutfak personellerinin, yoğun iş ve hareket akışının ve çalışma temposunun olmamasının verdiği olumsuz durumun glutensiz besinlerde gerçekleşmesi beklenen gluten kontaminasyon düzeyine engel olduğu ve sonuçları önemli ölçüde etkilediği düşünülmektedir. Yine gerçek kurum mutfağındaki ortam ısısının ve neminin farklı olması etkileyen etmenlerden biridir. Laboratuvarda kullanılan havalandırma sistemi de ortamın hava akışını ve hava hareketlerini etkileyebilecek etkenlerden olabilir.

Çalışmamızda uygulama süresince kullanılan buğday unu miktarının (toplamda 3 kg) gerçek kurum mutfaklarında kullanılan miktara göre oldukça az olması ve buna rağmen uygulamanın yapıldığı alanının ve hacminin fazla olması da çalışmanın sonuçlarını olumsuz etkileyen başlıca etmenler olarak düşünülmektedir.

Uygulamaya katılan aşçının doğal çalışma ortamında olmayıp, hangi konu üzerine olduğunu bilmemesine rağmen bir deney planında yer alıyor olması, hijyen prosedürlerine normalde toplu beslenme yapan kurum mutfaklarında gösterilen özenden daha fazla özen göstermesine, bu sebeple daha temiz ve düzenli çalışmasına sebep olmuştur. Bu da glutensiz besinlerde meydana gelmesi beklenen gluten bulaşını engellemiştir. Bunun da çalışmamızın bir başka kısıtlayıcısı olduğu düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

Bu çalışma; gluten içeren unlu besin hazırlanırken hazırlama alanındaki glutensiz ürünlerde çapraz bulaş nedeni ile oluşabilecek gluten kontaminasyon düzeyini, gluten kontaminasyonuna glutensiz besinin yer aldığı mesafenin etkisini, kontaminasyonu engellemek için glutensiz besinin yer alması gereken en uygun minimum uzaklık mesafesini ve gluten içeren unlu besinleri hazırlama süresinin aynı ortamdaki glutensiz besinlerde meydana gelen gluten kontaminasyonu düzeyine etkisini belirlemek amacıyla planlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

1. Toplamda 46 glutensiz besin örneği toplanarak analiz edilmiştir. Örneklerin tümünde gluten kontaminasyon düzeyi 20 ppm'in altında olarak belirlenmiştir.
2. Aşçının arkasında bulunan hazırlama alanına en yakın mesafedeki bankonun, sıklıkla kullandığı tartının, el yıkama evyesinin, ocağın yanına ve kullandığı fırının üstüne konumlandırılmış olan glutensiz besin örneklerinde tespit edilen gluten kontaminasyon düzeyi yasal sınırın altında olmasına rağmen, en yüksek bulaş tüm malzemelerin ölçümünün yapıldığı tartı yanındaki örnekte tespit edilmiştir.
3. Buğday unu kullanım alanına artan mesafelerde konumlandırılan 40 örneğin gluten kontaminasyon düzeyleri, kontrol örneğinin gluten düzeyi olan 0,33 ppm'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).
4. Buğday unu kullanımına artan sürelerde maruz kalan 40 örneğin gluten kontaminasyon düzeyleri, kontrol örneğinin gluten düzeyi olan 0,33 ppm'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).
5. Glutensiz besin örneklerinde meydana gelen gluten kontaminasyon düzeyine, buğday unu kullanım alanından uzaklık mesafesinin istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $p=0,252$ ).

6. Glutensiz besin örneklerinde meydana gelen gluten kontaminasyon düzeyine, buğday unu kullanımına maruz kalma süresinin istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ( $p=0,856$ ).
7. Yapılan çalışma sonuçlarına göre, bulaş düzeylerinin yasal limitin altında olmasına rağmen, en fazla bulaş mesafesinin 0,5 metre ve bulaş maruziyet süresinin 1 saat olduğu belirlenmiştir.

## 6.2. Öneriler

Bu çalışma, gluten içeren unlu besin hazırlanırken hazırlama alanındaki glutensiz ürünlerde çapraz bulaşı ölçen alanındaki ilk çalışmadır ve yapılacak ileri çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre gluten bulaşı yasal limitlerin altında olmasına rağmen özellikle buğday alerjisi olan bireyler için alerjik reaksiyonları tetikleyebilir. Ayrıca bireyler sadece bir üründen yasal limitin altında gluten alımına maruz kalsalar dahi bu miktar çölyak hastalarında günlük maksimum gluten alım düzeyine katkıda bulunarak hastalar için risk oluşturmaktadır.

Gluten bulaşının önlenmesi için ev ya da toplu beslenme hizmeti veren kuruluşlarda kullanılacak un miktarının yoğunluğuna bağlı olarak hazırlama alanlarının arasında belirli mesafenin olması gereklidir.

Günümüzde toplu beslenme hizmeti veren kuruluşlardan yararlanma oranı göz önünde bulundurulduğunda, besin hazırlamada kullanılan hammadde bilgisine ulaşılsa da olası çapraz kontaminasyona karşı herhangi yasal bir düzenleme bulunmamaktadır. Bu nedenle toplu beslenme sistemlerinde üretilen menülerde gluten kontaminasyonuna karşı menü etiketleme sistemine geçilmelidir. Bununla birlikte, toplu beslenme yapan kuruluşlarda besin hazırlarken çapraz kontaminasyon kaynaklarının düşünülerek allerjen listesinde yayınlanmış, diğer allerjen içerikli besinlerin hazırlanmasında oluşabilecek çapraz bulaş ile ilgili de menü etiketleme çalışmaları yapılmalıdır.

Ayrıca, toplu beslenme hizmeti veren kurumlarda gluten ve diğer alerjen içerikli besinlerden oluşabilecek bulaş riskleri ile ilgili çalışanlara detaylı eğitimler verilmesi ve konu ile ilgili ileri çalışmalar yapılması gereklidir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Ward RK. Introduction to food allergy. Handbook of Food Allergen Detection and Control 2015. p. 1-15.
2. Panel EN. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. EFSA J. 2014;12:3894.
3. Koerner TB, Cleroux C, Poirier C, Cantin I, Alimkulov A, Elamparo H. Gluten contamination in the Canadian commercial oat supply. Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. 2011;28(6):705-10.
4. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the Diagnosis and Management of Food Allergy in the United States: Report of the NIAID-Sponsored Expert Panel. AACI. 2010;126(6 0):S1-58.
5. Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act of 2004 [Internet]. 2016 [Erişim Tarihi 1 Kasım 2017]. Erişim Adresi : <https://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/allergens/ucm106187.htm>.
6. Keet CA, Matsui EC, Dhillon G, Lenehan P, Paterakis M, Wood RA. The natural history of wheat allergy. Ann Allergy Asthma Immunol. 2009;102(5):410-5.
7. Scherf KA, Koehler P, Wieser H. Gluten and wheat sensitivities – An overview. J Cereal Sci. 2016;67:2-11.
8. Standard For Foods For Special Dietary Use For Persons Intolerant To Gluten Codex Stan. 2015: 118-1979.
9. Elli L, Branchi F, Tomba C, Villalta D, Norsa L, Ferretti F, et al. Diagnosis of gluten related disorders: celiac disease, wheat allergy and non-coeliac gluten sensitivity. World Journal of Gastroenterology: World J Gastroenterol. 2015;21(23):7110.
10. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. Food Microbiology. 2007;24(2):115-9.
11. Henggeler JC, Veríssimo M, Ramos F. Non-coeliac gluten sensitivity: A review of the literature. Trends in Food Sci Technol. 2017;66(Supplement C):84-92.
12. Farage P, Puppini Zandonadi R, Cortez Ginani V, Gandolfi L, Pratesi R, de Medeiros Nóbrega YK. Content Validation and Semantic Evaluation of a Check-List Elaborated for the Prevention of Gluten Cross-Contamination in Food Services. Nutrients. 2017;9(1):36.
13. Farage P, Zandonadi R. The gluten-free diet: difficulties celiac disease patients have to face daily. Austin J Nutr Food Sci. 2014;2(5):1027.
14. The Commission Of The European Communities. Concerning The Composition And Labelling Of Food stuffs Suitable For People Intolerant To Gluten. Official Journal of the European Union. 2009. 41/2009.

15. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Türk Gıda Kodeksi Gluten İntoleransi Olan Bireylere Uygun Gıdalar Tebliği. 2012. Tebliğ No: 2012/4
16. Farage P, de Medeiros Nobrega YK, Pratesi R, Gandolfi L, Assuncao P, Zandonadi RP. Gluten contamination in gluten-free bakery products: a risk for coeliac disease patients. *Public Health Nutr.* 2017;20(3):413-6.
17. Bilici S. Toplu Beslenme Sistemleri Çalışanları İçin Hijyen El Kitabı. TC Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Beslenme Bilgi Serisi. 2008;1.
18. Merdol TK. Toplu Beslenme Servisi (TBS) Yapılan Kurumların Tanımı, Özellikleri, Beslenme Servisi Örgütü. In: Merdol Tk, editor. Toplu Beslenme Servisi (TBS) Sağlıklı Yönetim Rehberi. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2015. p. 41-68.
19. Lawson J, Hunt C, Glew G. Nutrition in catering. *Nutr Bull.* 1983;8(2):93-104.
20. Garayoa R, Vitas AI, Díez-Leturia M, García-Jalón I. Food safety and the contract catering companies: Food handlers, facilities and HACCP evaluation. *Food Control.* 2011;22(12):2006-12.
21. Mitchell R. Public Health Measures: Management of Food Safety in Food Service Sector A2 - Motarjemi, Yasmine. *Encyclopedia of Food Safety.* Waltham: Academic Press; 2014. p. 133-9.
22. Nerín C, Aznar M, Carrizo D. Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology.* 2016;48:63-8.
23. Soman R, Raman M. HACCP system – hazard analysis and assessment, based on ISO 22000:2005 methodology. *Food Control.* 2016;69(Supplement C):191-5.
24. Good hygiene practices and HACCP [Internet]. 2017[Erişim Tarihi 2 Kasım 2017]. Erişim Adresi: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/capacity-development/haccp/en/>.
25. Pérez-Rodríguez F, Valero A, Carrasco E, García RM, Zurera G. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology.* 2008;19(3):131-44.
26. June Payne-Palacio, Theis M. Food Safety. *Foodservice Management: principles and practices:* Pearson; 2012. p. 72.
27. Batt CA. Chemical and Physical Hazards in Food. *Reference Module in Food Science:* Elsevier; 2016.
28. Dzwolak W. Assessment of food allergen management in small food facilities. *Food Control.* 2017;73(Part B):323-31.
29. Hattersley S, Ward R, Baka A, Crevel RW. Advances in the risk management of unintended presence of allergenic foods in manufactured food products--an overview. *Food Chem Toxicol.* 2014;67:255-61.
30. Ortiz JC, Galan-Malo P, Garcia-Galvez M, Mateos A, Ortiz-Ramos M, Razquin P, et al. Survey on the occurrence of allergens on food-contact surfaces from school canteen kitchens. *Food Control.* 2018;84(Supplement C):449-54.



31. Crevel RWR, Cochrane SA. Food Safety Assurance Systems: Management of Allergens in Food Industry A2 - Motarjemi, Yasmine. Encyclopedia of Food Safety. Waltham: Academic Press; 2014. p. 254-61.
32. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar S, Muraro A, Werfel T, Cardona V, et al. The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2014;69(1):62-75.
33. Fortner C. Food Allergies: Supporting Safety in the School Environment[Internet]. 2017 [Erişim Tarihi 1 kasım 2017]. Erişim Adresi: <https://www.usda.gov/media/blog/2017/05/18/food-allergies-supporting-safety-school-environment>.
34. Nwaru BI, Panesar SS, Hickstein L, Rader T, Werfel T, Muraro A, et al. The epidemiology of food allergy in Europe: protocol for a systematic review. *Clin and Transl Allergy*. 2013;3(1):13.
35. Taylor SL, Baumert JL. Cross-Contamination of Foods and Implications for Food Allergic Patients. *Curr Allergy Asthm R*. 2010;10(4):265-70.
36. Jackson LS, Al-Taher FM, Moorman M, DeVRIES JW, Tippett R, Swanson KM, et al. Cleaning and other control and validation strategies to prevent allergen cross-contact in food-processing operations. *J Food Protect*. 2008;71(2):445-58.
37. Allergies F. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Information Note No. 3/2006.
38. Frequently Asked Questions about Food Allergies [Internet]. 2017. [Erişim Tarihi 1 Kasım 2017]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAllergens/ucm530854.htm>.
39. Bock SA, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *AAIC*. 2001;107(1):191-3.
40. Furlong TJ, DeSimone J, Sicherer SH. Peanut and tree nut allergic reactions in restaurants and other food establishments. *AAIC*. 2001;108(5):867-70.
41. Anibarro B, Seoane F, Mugica M. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(3):168.
42. Commission CA. General Standard For The Labelling Of Prepackaged Foods .Rome;2007. Codex Stan 1-1985.
43. Gendel SM. Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. 2012;63(2):279-85.
44. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Gıda Etiketleme ve Tüketicileri Bilgilendirme Yönetmeliği. 2017. Sayı : 29960
45. Shewry PR. Cereal grain proteins. In: Henry RJ, Kettlewell PS, editors. *Cereal Grain Quality*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1996. p. 227-50.

46. Verhoeckx KC, Vissers YM, Baumert JL, Faludi R, Feys M, Flanagan S, et al. Food processing and allergenicity. *Food Chem Toxicol.* 2015;80:223-40.
47. Chinuki Y, Morita E. Wheat-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis Sensitized with Hydrolyzed Wheat Protein in Soap. *Allergology International.* 2012;61(4):529-37.
48. Scherf K, Köhler P. Wheat and gluten: technological and health aspects. *Ernährungs Um-schau.*2016;63 (08): 166–175
49. Rallabhandi P. Gluten and celiac disease--an immunological perspective. *J AOAC Int.* 2012;95(2):349-55.
50. Köksal G, Gökmen H. Çocuk hastalıklarında beslenme tedavisi. Hatipoğlu Yayınları, Bölüm. 2000;14.
51. Koehler P, Wieser H, Konitzer K. Chapter 2 - Gluten—The Precipitating Factor. *Celiac Disease and Gluten.* Boston: Academic Press; 2014. p. 97-148.
52. Jouanin A, Gilissen LJWJ, Boyd LA, Cockram J, Leigh FJ, Wallington EJ, et al. Food processing and breeding strategies for coeliac-safe and healthy wheat products. *Food Research International.* 2017.
53. Balakireva AV, Zamyatnin AA. Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients.* 2016;8(10).
54. Malalgoda M, Simsek S. Celiac disease and cereal proteins. *Food Hydrocolloids.* 2017;68(Supplement C):108-13.
55. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2013;62(1):43-52.
56. Pinto-Sanchez MI, Causada-Calo N, Bercik P, Ford AC, Murray JA, Armstrong D, et al. Safety of Adding Oats to a Gluten-Free Diet for Patients With Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis of Clinical and Observational Studies. *Gastroenterology.* 2017;153(2):395-409 e3.
57. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC medicine.* 2012;10(1):13.
58. Demirçeken FG. Gluten enteropatisi (Çölyak hastalığı): klasik bir öykü ve güncel gelişmeler. *Güncel Gastroenteroloji.* 2011;15(1).
59. What Is Celiac Disease?[Internet].[Erişim Tarihi 5 Kasım 2017]. Erişim adresi: <https://celiac.org/celiac-disease/understanding-celiac-disease-2/what-is-celiac-disease/>.
60. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut.* 2002;50(5):624-8.
61. Soya S, Ün C. Çölyak hastalığındaki moleküler ve genetik gelişmeler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 2014;57:274-82.

62. Baysal A, Aksoy M, Besler T, Bozkurt N, Keçecioglu S, Mercanlıgil S, et al. Diyet El Kitabı. 6'ıncı baskı. Ankara, Hatiboğlu yayınları. 2011.
63. Ludvigsson JF, Green PH. The missing environmental factor in celiac disease. *J Med.* 2014;371:1285-94.
64. Hadjivassiliou M. Gluten Ataxia. *Encyclopedia of Movement Disorders.* Oxford: Academic Press; 2010. p. 557-9.
65. Hadjivassiliou, M., Sanders, D. S., Grünewald, R. A., Woodroffe, N., Boscolo, S., & Aeschlimann, D. Gluten sensitivity: from gut to brain. *The Lancet Neurology*, 2010;9(3), 318-330.
66. Pizzorno JE, Murray MT, Joiner-Bey H. 22 - Dermatitis herpetiformis. *The Clinician's Handbook of Natural Medicine* (third edition). Edinburgh: Churchill Livingstone; 2016. p. 245-8.
67. Duhring LA. Landmark article, Aug 30, 1884: Dermatitis herpetiformis. By Louis A. Duhring. *JAMA.* 1983;250(2):212-16.
68. Jackson JB. Dermatitis Herpetiformis. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* New York: Elsevier; 2007. p. 1-4.
69. Kárpáti S. Dermatitis herpetiformis. *Clinics in Dermatology.* 2012;30(1):56-9.
70. Bolotin D, Petronic-Rosic V. Dermatitis herpetiformis: Part I. Epidemiology, pathogenesis, and clinical presentation. *J Am Acad Dermatol.* 2011;64(6):1017-24.
71. Cardones ARG, Hall RP. Management of Dermatitis Herpetiformis. *Dermatologic Clinics.* 2011;29(4):631-5.
72. Kaimal S, Thappa DM. Diet in dermatology: revisited. *Indian J Dermatol.Venereology, and Leprology.* 2010;76(2):103.
73. Armentia A, de Luis D, Crespo J, Inglada L, Castrodeza J, Martín-Armentia S. Chapter 13 - Wheat Allergy A2 - Watson, Ronald Ross. In: Preedy VR, editor. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases.* San Diego: Academic Press; 2013. p. 189-202.
74. Husby S, Olsson C, Ivarsson A. Chapter seven - Celiac Disease and Risk Management of Gluten A2 - Madsen, Charlotte Bernhard. In: Crevel RWR, Mills C, Taylor SL, editors. *Risk Management for Food Allergy.* San Diego: Academic Press; 2014. p. 129-52.
75. Pietzak M. Chapter 11 - Immunologic Reactions to Wheat: Celiac Disease, Wheat Allergy and Gluten Sensitivity A2 - Watson, Ronald Ross. In: Preedy VR, Zibadi S, editors. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health.* San Diego: Academic Press; 2014. p. 133-41.
76. Green PHR, Lebwohl B, Greywoode R. Celiac disease. *AAIC.* 2015;135(5):1099-106.
77. Inomata N. Wheat allergy. *Curr opin allergy and clin immunol.* 2009;9(3):238-43.

78. Salvatori N, Reccardini F, Convento M, Purinan A, Colle R, De Carli S, et al. Asthma induced by inhalation of flour in adults with food allergy to wheat. *Clin Exp Allergy*. 2008;38(8):1349-56.
79. Tam C-J, John RM. Food-Dependent Exercise-Induced Anaphylaxis: A Review. *The J Nurse Pract*. 2017;13(5):313-21.
80. Brockow K, Kneissl D, Valentini L, Zelger O, Grosber M, Kugler C, et al. Using a gluten oral food challenge protocol to improve diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *AACI*.2015;135(4):977-84.e4.
81. Fujii H, Kambe N, Fujisawa A, Kohno K, Morita E, Miyachi Y. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis induced by low dose aspirin therapy. *Allergology International*. 2008;57(1):97-8.
82. Gonzalez-Quintela A, Vidal C, Gude F. Alcohol, IgE and allergy. *Addict Biol*. 2004;9(3-4):195-204.
83. Bito T, Kanda E, Tanaka M, Fukunaga A, Horikawa T, Nishigori C. Cows milk-dependent exercise-induced anaphylaxis under the condition of a premenstrual or ovulatory phase following skin sensitization. *Allergology International*. 2008;57(4):437-9.
84. Feldweg AM. Food-Dependent, Exercise-Induced Anaphylaxis: Diagnosis and Management in the Outpatient Setting. *AAIC*.2017;5(2):283-8.
85. Matsuo H, Morita E, Tatham AS, Morimoto K, Horikawa T, Osuna H, et al. Identification of the IgE-binding epitope in  $\omega$ -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Biol Chem*. 2004;279(13):12135-40.
86. Morita E, Matsuo H, Chinuki Y, Takahashi H, Dahlström J, Tanaka A. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis-importance of omega-5 gliadin and HMW-glutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergology International*. 2009;58(4):493-8.
87. McFadden J. Immunologic Contact Urticaria. *Immunol Allergy Clin North Am*.2014;34(1):157-67.
88. Verhulst L, Goossens A. Cosmetic components causing contact urticaria: a review and update. *Contact dermatitis*. 2016.
89. Fasano A, Sapone A, Zavallos V, Schuppan D. Nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1195-204.
90. Nylund L, Kaukinen K, Lindfors K. The microbiota as a component of the celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *Clinical Nutrition Experimental*. 2016;6(Supplement C):17-24.
91. Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR. No Effects of Gluten in Patients With Self-Reported Non-Celiac Gluten Sensitivity After Dietary Reduction of Fermentable, Poorly Absorbed, Short-Chain Carbohydrates. *Gastroenterology*. 2013;145(2):320-8.e3.

92. Vanga R, Leffler DA. Gluten sensitivity: not celiac and not certain. *Gastroenterology*. 2013;145(2):276-9.
93. Farage P, Puppini Zandonadi R, Cortez Ginani V, Gandolfi L, Pratesi R, de Medeiros Nobrega YK. Content Validation and Semantic Evaluation of a Check-List Elaborated for the Prevention of Gluten Cross-Contamination in Food Services. *Nutrients*. 2017;9(1).
94. Sharma GM, Pereira M, Williams KM. Gluten detection in foods available in the United States – A market survey. *Food Chemistry*. 2015;169(Supplement C):120-6.
95. Koerner TB, Cleroux C, Poirier C, Cantin I, La Vieille S, Hayward S, et al. Gluten contamination of naturally gluten-free flours and starches used by Canadians with celiac disease. *Food Addit & Contam. Part A*. 2013;30(12):2017-21.
96. Thompson T, Lee AR, Grace T. Gluten Contamination of Grains, Seeds, and Flours in the United States: A Pilot Study. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(6):937-40.
97. Akobeng AK, Thomas AG. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment pharmacol ther*. 2008;27(11):1044-52.
98. Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, Mäki M, Moneret-Vautrin D, Romano A, et al. Safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment pharmacol ther*. 2006;23(5):559-75.
99. Questions and Answers: Gluten-Free Food Labeling Final Rule [Internet]. 2016 [Erişim Tarihi 2 Kasım 2017]. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Allergens/ucm362880.htm>.
100. Health Canada's Position on Gluten-Free Claims [Internet]. 2012 [Erişim tarihi 3 Kasım 2017]. Erişim adresi: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-allergies-intolerances/celiac-disease/health-canada-position-gluten-free-claims.html>.
101. Agency FS. Labelling of 'gluten free' foods [Internet]. 2016 [Erişim tarihi 4 Ocak 2018]. Erişim adresi: <https://www.food.gov.uk/business-industry/allergy-guide/labelling-of-gluten-free-foods>.
102. Celiace PNDDYCDE. Legislacion Vigente [Internet]. 2017 [Erişim tarihi 4 Ocak 2018]. Erişim adresi: <http://www.msal.gob.ar/celiacos/legislacion.html>.
103. (FSANZ) FSANZ. Food Standards Australia New Zealand 2018 [Available from: <http://www.foodstandards.gov.au/Pages/default.aspx>].
104. Hlywiak KH. Hidden sources of gluten. *Pract Gastroenterol*. 2008;32:27-39.
105. Regulation (EU) No 1169/2011 Of The European Parliament And Of The Council [Internet]. 2011 [Erişim tarihi 6 Ocak 2018]. Erişim adresi: <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011R1169&from=EN>.

106. Nasr I, Messing J, Nasr IH, Ciclitira PJ. 19 - Detection and control of gluten as a food allergen A2 - Flanagan, Simon. Handbook of Food Allergen Detection and Control: Woodhead Publishing; 2015. p. 367-77.
107. Rosell CM, Barro F, Sousa C, Mena MC. Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. *J Cereal Sci.* 2014;59(3):354-64.
108. Haraszi R, Chassaigne H, Maquet A, Ulberth F. Analytical methods for detection of gluten in food—method developments in support of food labeling legislation. *J AOAC Int.* 2011;94(4):1006-25.
109. Scherf KA, Poms RE. Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *J Cereal Sci.* 2016;67(Supplement C):112-22.
110. Mujico JR, Lombardía M, Mena MC, Méndez E, Albar JP. A highly sensitive real-time PCR system for quantification of wheat contamination in gluten-free food for celiac patients. *Food Chemistry.* 2011;128(3):795-801.
111. AOAC. Official Methods of Analysis [Internet].2018 [Erişim Tarihi: 23 ocak 2018].Erişim adresi: <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=27144>.
112. Lee HJ, Anderson Z, Ryu D. Gluten contamination in foods labeled as "gluten free" in the United States. *J Food Prot.* 2014;77(10):1830-3.
113. Gélinas P, McKinnon CM, Mena MC, Méndez E. Gluten contamination of cereal foods in Canada.*Int J Food Sci Technol.* 2008;43(7):1245-52.
114. Hassan H, Elaridi J, Bassil M. Evaluation of gluten in gluten-free-labeled foods and assessment of exposure level to gluten among celiac patients in Lebanon. *Int J Food Sci Nutr.* 2017;68(7):881-6.
115. Sharma GM, Pereira M, Williams KM. Gluten detection in foods available in the United States - a market survey. *Food Chem.* 2015;169:120-6.
116. Verma AK, Gatti S, Galeazzi T, Monachesi C, Padella L, Del Baldo G, et al. Gluten contamination in naturally or labeled gluten-free products marketed in Italy. *Nutrients.* 2017;9(2).
117. Thompson T, Lee AR, Grace T. Gluten contamination of grains, seeds, and flours in the United States: a pilot study. *J Am Diet Assoc.* 2010;110(6):937-40.
118. Størsrud S, Malmheden Yman I, Lenner RA. Gluten contamination in oat products and products naturally free from gluten. *Eur Food Res Technol.* 2003;217(6):481-5.
119. Naqash F, Gani A, Gani A, Masoodi FA. Gluten-free baking: Combating the challenges - A review. *Trends in Food Sci Technol.* 2017;66(Supplement C):98-107.
120. Eigenmann P, Zamora SA. An internet-based survey on the circumstances of food-induced reactions following the diagnosis of IgE-mediated food allergy. *Allergy.* 2002;57(5):449-53.
121. Ahuja R, Sicherer SH. Foodallergy management from the perspective of restaurant and food establishment personnel. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2007;98(4):344-8.

122. Lessa K, Lozano M, Esteve M, Frigola A. Food Allergy Knowledge, Attitudes and Practices: A Pilot Study of the General Public and Food Handlers. 2016.
123. Radke TJ, Brown LG, Hoover ER, Faw BV, Reimann D, Wong MR, et al. Food Allergy Knowledge and Attitudes of Restaurant Managers and Staff: An EHS-Net Study. *J Food Protect.* 2016;79(9):1588-98.
124. Sogut A, Kavut AB, Kartal I, Beyhun EN, Cayir A, Mutlu M, et al. Food allergy knowledge and attitude of restaurant personnel in Turkey. *Int forum allergy rhinol* 2015;5(2):157-61.
125. Wham CA, Sharma KM. Knowledge of café and restaurant managers to provide a safe meal to food allergic consumers. *Nutrition & dietetics.* 2014;71(4):265-9.
126. Oliveira OMV, Zandonadi RP, Gandolfi L, de Almeida RC, Almeida LM, Pratesi R. Evaluation of the presence of gluten in beans served at self-service restaurants: A problem for celiac disease carriers. *Journal of Culinary Science & Technology.* 2014;12(1):22-33.
127. Education FARA. What Is A Food Allergy?[Internet].2017 [Erişim tarihi 17 aralık 2017]. Erişim adresi: <https://www.foodallergy.org/life-with-food-allergies/food-allergy-101/what-is-a-food-allergy>.
128. Miller K, McGough N, Urwin H. Catering Gluten-Free When Simultaneously Using Wheat Flour. *J Food Protect.* 2016;79(2):282-7.
129. Hitchenhuber C, Crevel R, Jarry B, Mäki M, Moneret-Vautrin DA, Romano A, et al. Review article: Safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23(5):559-75.

## 8. EKLER

## EK- 1: Uygulamada Kullanılan Gramajlar

Poğaç	
İçindekiler	Miktar
Un	1 kg
Tuz	15 gram
Şeker	40 gram
Yumurta	3 adet
Margarin	500 gram
Yaş maya	50 gram
Beyaz Peynir	500 gram

Açma	
İçindekiler	Miktar
Un	1 kg
Tuz	15 gram
Şeker	60 gram
Sıvı yağ	100 mL
Margarin	150 gram
Yaş maya	50 gram
Yumurta	2 adet

Serpme Börek	
İçindekiler	Miktar
Un	1 kg
Limon Suyu	5 gram
Tuz	15 gram
Patates	350 gram
Margarin	250 gram
Yumurta	2 adet
Maydanoz	1 demet



EK- 2: Kit Protokolü

# **ALLER-TEK™**

## **GLUTEN ELISA**



**For the quantitation of total gluten  
in raw and processed foods**

### **INSTRUCTIONS FOR USE**

ALLER-TEK Gluten ELISA – Catalog # 510821



## WHAT IS GLUTEN?

Gluten is the common name for a combination of water-insoluble proteins (a combination of gliadin and glutenin) found in the seeds of wheat, rye and barley. Celiac disease affects nearly 1% of the populations of Europe and North America<sup>1</sup> with gluten sensitivities affecting up to 6% of the US population. Persons with celiac disease and gluten sensitivity have a heightened immunologic response to ingested gluten, resulting in a range of symptoms including bowel irritability, diarrhea, anemia, arthralgia, fatigue, infertility, dermatitis, neurological disorders.

For persons with gluten sensitivity, the only treatment for these conditions is the adoption of a gluten-free diet, avoiding foods containing wheat, rye, barley and other related cereal grains. Due to the prevalence of these grains in the food supply, even products that do not contain wheat, rye or barley as ingredients may still contain trace amounts that are significant enough to produce symptoms in gluten-sensitive individuals.

## PURPOSE OF THE ALLER-TEK™ GLUTEN ELISA

The ALLER-TEK™ Gluten ELISA was designed to quantitate low levels of total gluten in food ingredients as well as in prepared and processed foods and beverages. By using a specific antibody (401.21)<sup>2</sup>, this assay recognizes both the gliadin and glutenin fractions of gluten to provide an accurate determination of total gluten levels in food and food products. The kit includes a standard curve for wheat gluten for quantitation between 5 and 80 ppm. For the accurate quantitation of barley gluten in samples suspected to contain barley but not wheat, rye or other related grains, a separate set of barley standards is available (Catalog No. 5108211).

## HOW THE TEST WORKS

The 401.21 antibody, which recognizes both the gliadin and glutenin fractions of gluten, is fixed to the wells of the 96-well plate, and binds to available gluten when samples or standards are added to the well. Any unbound material is removed in the first wash step. The Gluten Conjugate, which is a solution containing the same antibody bound to the horse radish peroxidase (HRP) enzyme, is then added and allowed to bind any gluten present in the wells. The second wash step removes any unbound gluten conjugate. Finally, a color substrate (TMB) is added, which causes a blue color change in proportion to the amount of HRP present in the well. The Stop Solution stops the TMB reaction and changes the blue color to yellow, and the intensity of this yellow color is then read on a plate reader.

1

**MATERIALS PROVIDED IN THE GLUTEN ASSAY**

- Gluten Assay Plate in a silver foil pouch.
- Bottle of Gluten Conjugate (12 mL), ready to use.
- (8) Gluten Standards (0, 5, 10, 20, 40, 80 ppm; 1 mL each), ready to use.
- Bottle of Sample Dilution Buffer (25 mL), ready to use.
- Packets of Extraction Solution Mix. Each individual packet makes 250 mL of Extraction Solution (see page 4).
- Bottle of TMB Substrate (12 mL), ready to use.
- Bottle of Stop Solution (12 mL), ready to use.
- Positive (PWC) and Negative (NWC) control flours (see page 4).

**MATERIALS/REAGENTS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- Blender or homogenizer to prepare samples
- Scale and weigh boats
- 15 mL conical tubes
- 10 mL serological pipettes
- Water bath
- Graduated cylinder (100 mL)
- Pipettors and tips
- Wash bottle or plate washer
- Flask for extraction solution
- Ethanol for extraction solution
- Distilled or deionized water
- Microplate reader capable of reading O.D. up to 3.500 at 450 nm

## PRECAUTIONS

- For food testing only.
- Do not use any part of the test beyond the expiration date.
- Do not open the foil pouch until just before use, and reseal any unused test strips in the foil pouch.
- Always store the kits between 2 and 8 °C; avoid freezing.
- Allow all kit components to come to room temperature before use.
- In case of contact of any reagent with eyes or skin; rinse immediately with plenty of water.

## DETAILED TEST INSTRUCTIONS

### Sample Preparation

1. Prior to testing, the person using the kit should wash their hands and make sure that the surface they are working on is clean and clear of any clutter.
2. For samples such as flours, baking mixes, smooth pastes and liquids, only homogenization is required.
3. Samples such as crackers, cookies, etc. may be crumbled by hand to a fine consistency. Harder samples should be ground in a blender or food processor.
4. Make sure that a multi-ingredient product, such as a baking mix, is thoroughly mixed prior to sampling. A food processor or other method of grinding may be required for harder samples.
5. It is important to take a sample that is representative of the total product that is in question. For instance, if it is a filled or frosted baked good, take a sample that includes all of the components in the ratio that they exist in the final product. Alternatively, the separate components of a product may be tested individually.
6. The goal of sample preparation is to obtain a sample with a fine consistency that is representative of the product as a whole.
7. Some samples may absorb a majority of the extraction solution. If there is not sufficient liquid present to run the assay, then the amount of sample added to the extraction solution may need to be reduced. This will affect the detection limit of the assay.

### Sample and Control Flour Extraction

1. Prepare the Extraction Solution by mixing 100 mL of ethanol ( $\geq 99\%$ ) with 150 mL of distilled water in a glass bottle or flask, then adding the contents of one Extraction Solution Mix. Swirl the container until the powder is completely dissolved. Heat at 45 °C if needed to get the powder into solution. The final solution will be slightly cloudy.
2. Measure out 1 g of each prepared sample and each control (PWC and NWC) into separate 15 mL conical tubes.
3. Add 10 mL of the prepared Extraction Solution.
4. Mix vigorously for 2 minutes, vortexing as needed to completely resuspend the samples and controls.
5. Place the tubes in a 45 °C waterbath and incubate for 15 minutes.
6. At the end of 15 minutes, remove the tubes from the bath and mix vigorously again for 2 minutes.
7. Place the tubes in a rack and allow to stand undisturbed for 30 minutes to allow the particulates to settle. Alternatively, take 1 mL of each extract, place in a 1.5 mL microcentrifuge tube, and centrifuge for 10 minutes at 500  $\times g$  (rcf).
8. Dilute the top, clear layer of the sample and control extracts (taken from the settled extraction tube or the spun microcentrifuge tube) 10 $\times$  with the Sample Dilution Buffer (e.g., add 50  $\mu$ L of extract to 450  $\mu$ L of Sample Dilution Buffer).

The diluted sample extracts are now ready to be tested.

Note: For samples containing  $>80$  ppm gluten, further dilutions up to 1,000 $\times$  can be made in Sample Dilution Buffer, although test accuracy may be reduced.

### Test Performance

1. Complete a plate plan showing the location of all standards, controls and samples (example on page 6). Take the required number of test strips out of the foil bag and place them in the rack. Return the unused strips to the foil pouch.
2. Pipette 100  $\mu$ L of each standard and diluted control and sample extract into the appropriate wells.
3. Incubate the plate at room temperature for one hour.
4. Wash the wells 6 times with distilled/deionized water.

- Add 100  $\mu$ L of Gluten Conjugate to each well.
- Incubate the plate at room temperature for one hour.
- Wash the plate 6 times with distilled/deionized water.
- Add 100  $\mu$ L of TMB Substrate to each well.
- Incubate the plate at room temperature for 10 minutes.
- Add 100  $\mu$ L of Stop Solution to each well.
- Read the plate at 450 nm.

#### Sample Plate Plan

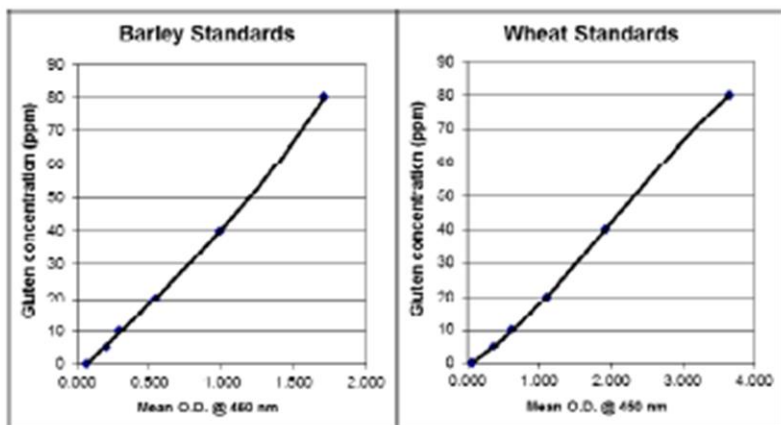
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DII	DII	PC	PC								
B	0 STD	0 STD	S1	S1								
C	5 STD	5 STD	S2	S2								
D	10 STD	10 STD	S3	S3								
E	20 STD	20 STD	S4	S4								
F	40 STD	40 STD	S5	S5								
G	80 STD	80 STD	S6	S6								
H	NC	NC	S7	S7								

DII = Sample Diluent, NC = Negative Control, PC = Positive Control, S1...n = Sample 1...n

#### Data Analysis

- Plot the concentration of each standard against its average O.D. reading (see sample graph) using Excel or another graphing program. The trend line for the standard curve should be a polynomial (typically 3<sup>rd</sup> order), depending on which gives the best fit (i.e., R<sup>2</sup> value closest to 1.000). You may also use the testing template provided on the product page of our website.
- Plot the mean O.D. of each sample on the standard curve and calculate the gluten concentration of the controls and samples using the trend line equation from your graphing program.
- The assay is valid if the negative control is negative (<5 ppm), and the positive control is between 5 and 40 ppm.

### Sample Standard Curves



### TEST LIMITATIONS

A negative result does not necessarily indicate a complete absence of gluten in the product being tested. It is always possible that gluten is present in a portion of the product that was not sampled, or that the level of gluten in the product is below the limit of detection for the test.

This kit will not detect extensively hydrolyzed gluten.

### KIT VALIDATION

The ALLER-TEK™ Gluten ELISA has been certified as a *Performance Tested Method<sup>SM</sup>* (#081202) by the AOAC Research Institute. A full copy of our validation report is available upon request.

### REFERENCES

1. Fasano A, Berli I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PHR, Guandalini S, Hill ID, Pletzak M, Ventura A., Thorpe M, Kryszak D, Fomaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. *Arch. Intern. Med.* 2003; 163: 286-292.
2. Skerrett, JH, Hill, AS. *J. Agric. Food Chem.* 1990; 38(8): 1771-1778.

**DISCLAIMER**

The results obtained using ELISA Technologies, Inc.'s kits are accurate only when following the instructions given in the kit instruction booklet. ELISA Technologies, Inc. shall not be liable for any damages arisen from improper use of the kit or from any action undertaken as a consequence of results obtained. Use of the kit for any other purpose other than its intended use shall not be permitted.

**Revision Notes**

140801-3: Replaced old logo with new logo, Changed "ELISA" to bold font.

140804: Replaced "Aler-Tek" with "ALLER-TEK™" throughout entire document.

150715: Edited for clarification.

151202: Added PTM™ mark, revised page number for extraction solution preparation.

**MANUFACTURED BY:**

**ELISA Technologies, Inc.**  
2501 NW 66<sup>th</sup> Court  
Gainesville, Florida 32653 USA  
Tel: (352) 337-3929  
Fax: (352) 337-3928  
info@elisa-tek.com  
[www.elisa-tek.com](http://www.elisa-tek.com)

rev. 151202



## 9. ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Lütfiye PARLAK
- Doğum Yeri ve Tarihi: Merzifon – 1992
- Uyuđu: Türkiye Cumhuriyeti
- İletişim Adresi ve Telefonu:  
[lutfiyeparlak@hacettepe.edu.tr](mailto:lutfiyeparlak@hacettepe.edu.tr)/+90(312)3051094-189

### II. Eğitim Bilgileri

- Yüksek Lisans (2016-2018):
  - Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Toplu Beslenme Sistemleri Programı,
  - University of Padova (ERASMUS)
- Lisans (2010-2014):
  - Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Beslenme ve Diyetetik Bölümü,
  - Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü (FARABİ)
- Lise (2006-2010): Amasya Gümüşhacıköy Anadolu Lisesi

### III. Mesleki Deneyimi

- Araştırma Görevlisi (2016-Halen): Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü
- Araştırma Görevlisi (2015-2016): Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü

### IV. Bilimsel Faaliyetleri

- 11-13 Mayıs 2017, Hacettepe Beslenme ve Diyetetik Günleri 6. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, Ankara,
- 13-14 Ekim 2017, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hastalıklarda Güncel Nütrisyon Yaklaşımları Sempozyumu, Ankara