

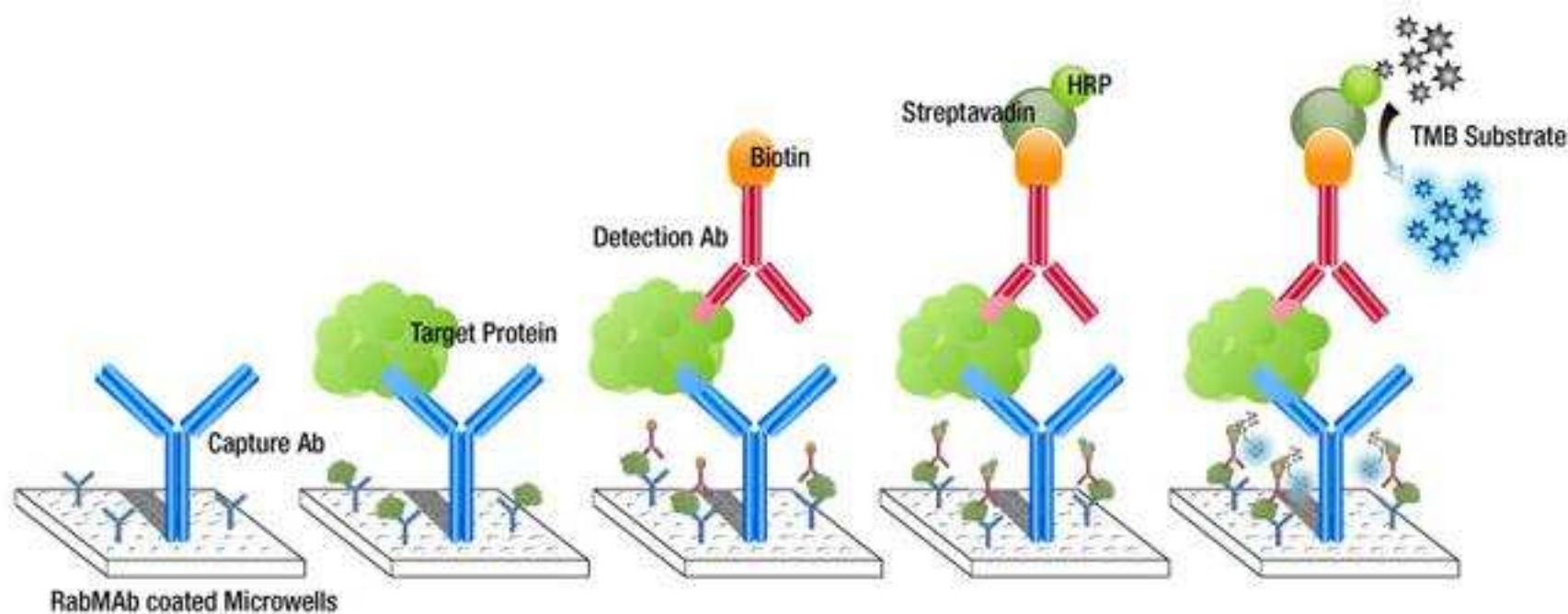


Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# ALLERGENI:



# TECNICHE ANALITICHE





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# TECNICHE IMMUNOCHEMICHE E ALLERGENI

- Risposta immunitaria, immunogenicità, anticorpi, legame antigene anticorpo (ELISA)
- Tecniche immunochimiche: marcatura e senza marcatura
- Diagramma di processo del dosaggio ELISA
- Allergeni alimentari e screening
- Glutine





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# RISPOSTA IMMUNITARIA

Il sistema immunitario serve per distinguere ciò che è proprio (**self**) da ciò che è estraneo all'organismo (**not self**). Qualsiasi molecola o organismo patogeno capace di indurre una risposta immunitaria è detto **antigene**.

**ANTIGENE:** molecola che, introdotta in un organismo, è in grado di **attivare la risposta anticorpale**.

Gli antigeni sono tipicamente macromolecole solubili in acqua e che possiedono un alto grado di complessità chimica.

**Proprietà:**

**IMMUNOGENICITÀ:** capacità di indurre una risposta immunitaria

**ANTIGENICITÀ:** capacità di reagire in maniera specifica con i prodotti finali delle risposte immunitarie (anticorpi e/o recettori di membrana)







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# Da che cosa dipende l'immunogenicità di una sostanza?

**Estraneità:** il sistema immunitario è in grado di discriminare il “self” dal “non self”, di conseguenza, le molecole estranee ad un determinato organismo hanno capacità immunogenica;

**Specie animale:** le proprietà immunogene di un antigene variano a seconda della specie animale utilizzata per la produzione di anticorpi;

**Peso molecolare:** più è elevato il peso molecolare della molecola in esame e maggiore sarà la possibilità di avere una risposta immunogenica;

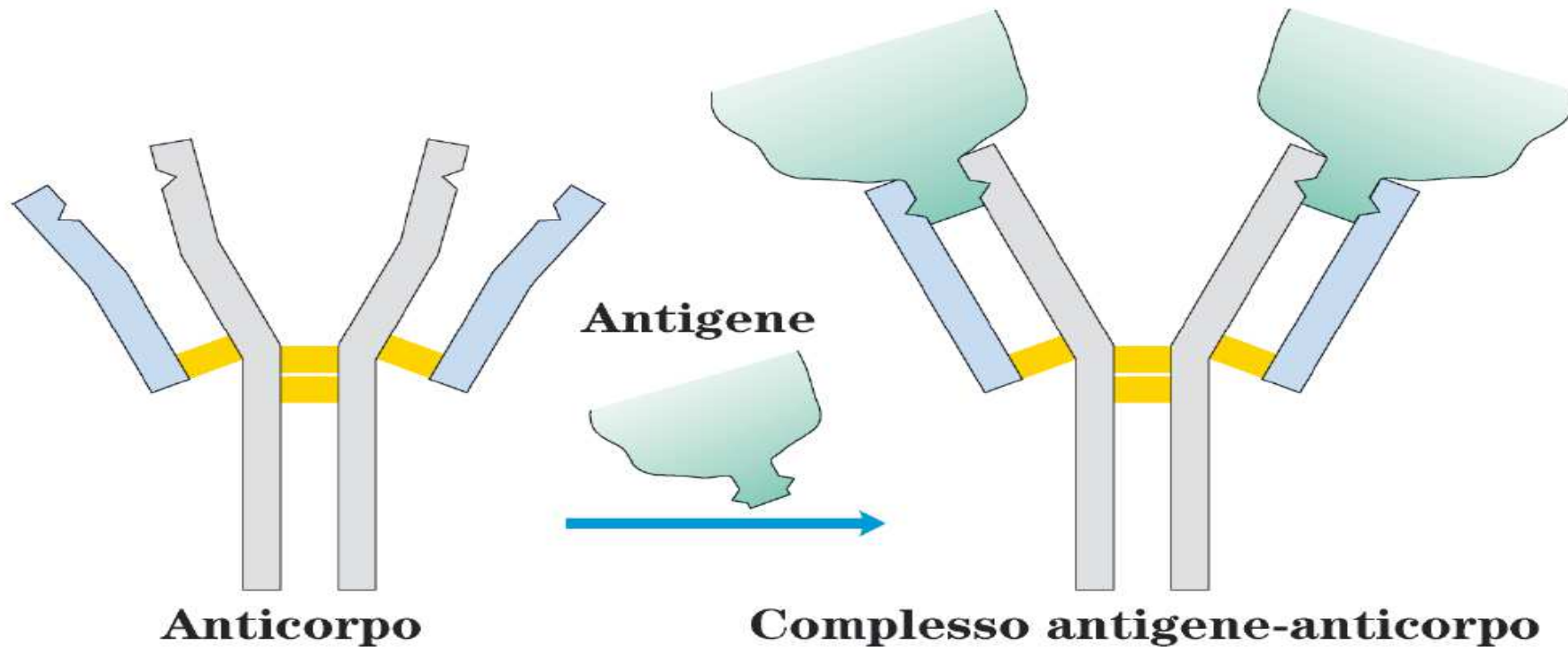
**Degradabilità:** macromolecole insolubili sono più immunogene di quelle più piccole e solubili, poiché vengono più facilmente fagocitate ed elaborate dal sistema macrofagico;

**Complessità chimica e strutturale delle molecole:** l'eterogeneità chimica apporta immunogenicità. Omopolimeri hanno bassa immunogenicità se confrontata con eteropolimeri dello stesso peso molecolare. Gli antigeni proteici risultano tanto più immunogeni quanto più sono complessi i loro livelli di organizzazione molecolare (struttura terziaria e quaternaria).



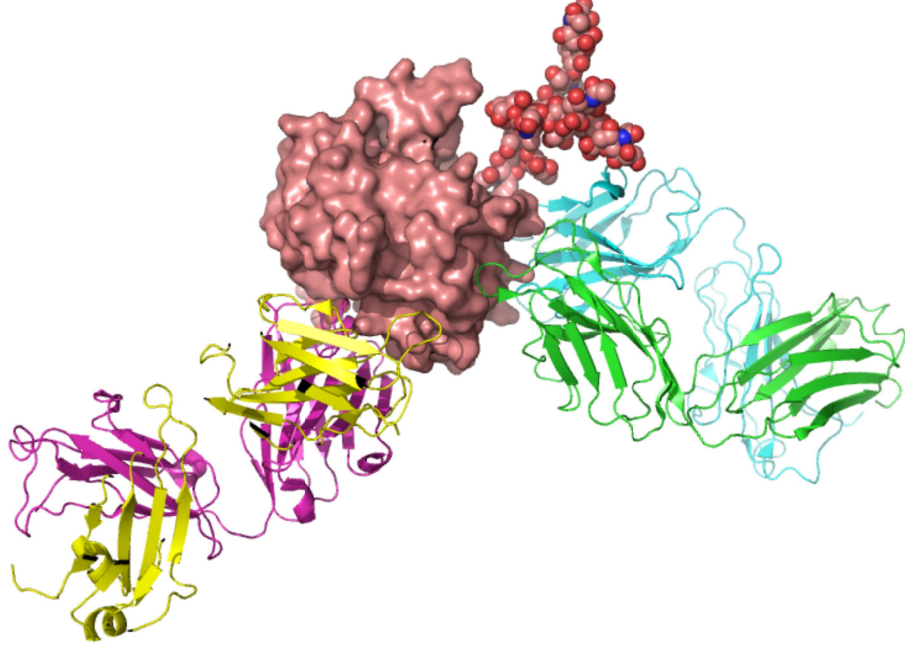
# Legame antigene-anticorpo

L'associazione tra antigene-anticorpo coinvolge interazioni di van der Waals, idrofobiche, ioniche e legami idrogeno. La specificità e l'affinità dipendono da una straordinaria complementarità strutturale tra le due molecole (**sistema chiave-serratura**).



# Tecniche immunochimiche

La specificità delle reazioni antigene-anticorpo e la sensibilità di “marcatori” (enzimi, isotopi, sostanze fluorescenti, radicali liberi) possono essere combinate insieme per compiere un “dosaggio immunologico”, ossia quantificare con precisione una sostanza antigenica, presente nei fluidi biologici.



# Tecniche immunochemiche

## IMMUNODOSAGGI

**Metodi con marcatura**  
(traccianti radioisotopici, enzimatici,  
fluorimetrici, bioluminescenti,  
chemiluminescenti)

**Metodi senza marcatura**

**Agglutinazione**  
Se avviene in  
soluzione acquosa

**Precipitazione**  
Se avviene in  
matrice solida

**Diretta**  
Se l'Ag è corpuscolato  
(cellule, batteri)

**Indiretta**  
se l'Ag solubile, si fa adsorbire o  
legare covalentemente a carrier  
insolubili (e.g. sfere di lattice)

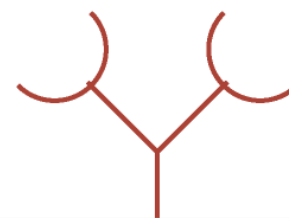
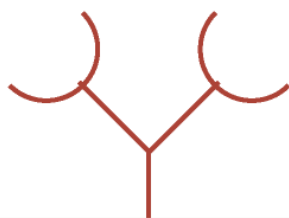
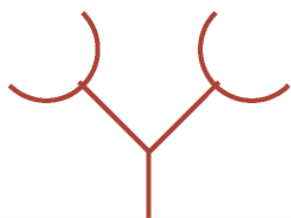




# Diagramma di processo del dosaggio ELISA

Primo  
anticorpo

1 Immobilizzazione  
del primo anticorpo  
su un supporto solido.

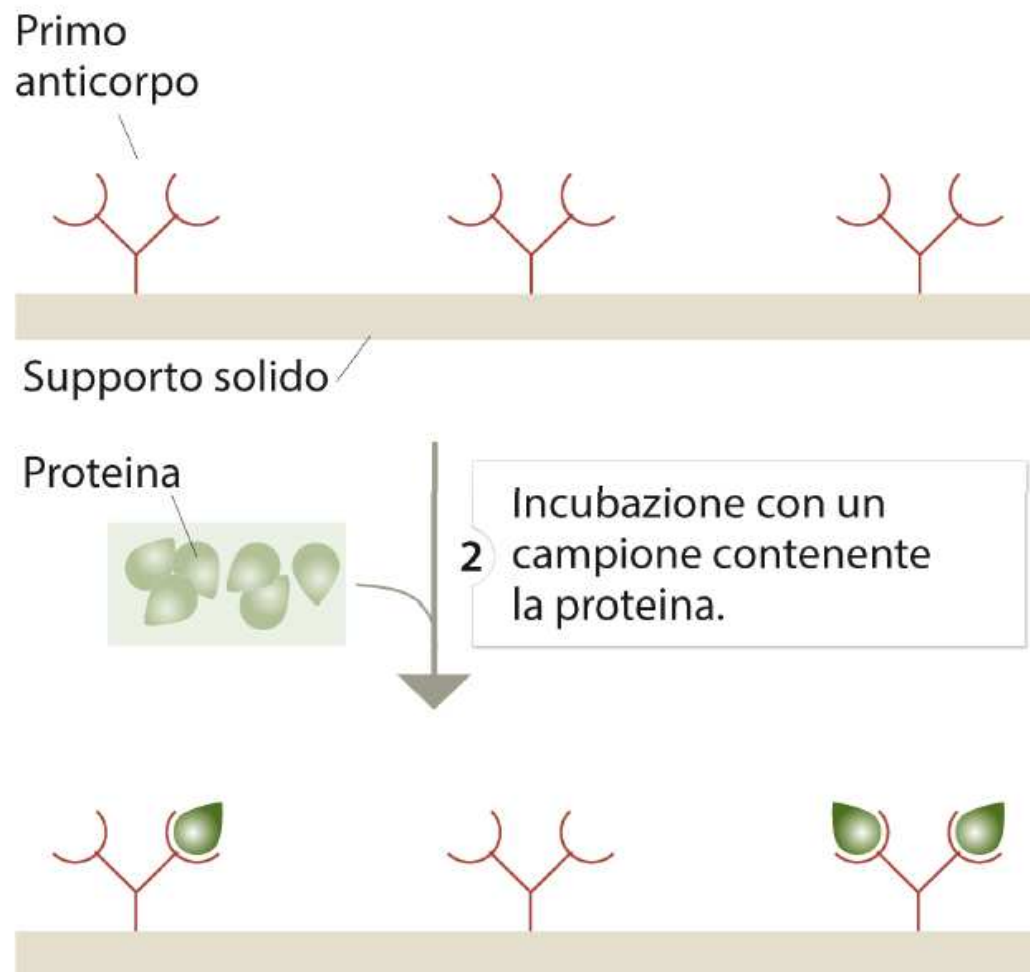


Supporto solido

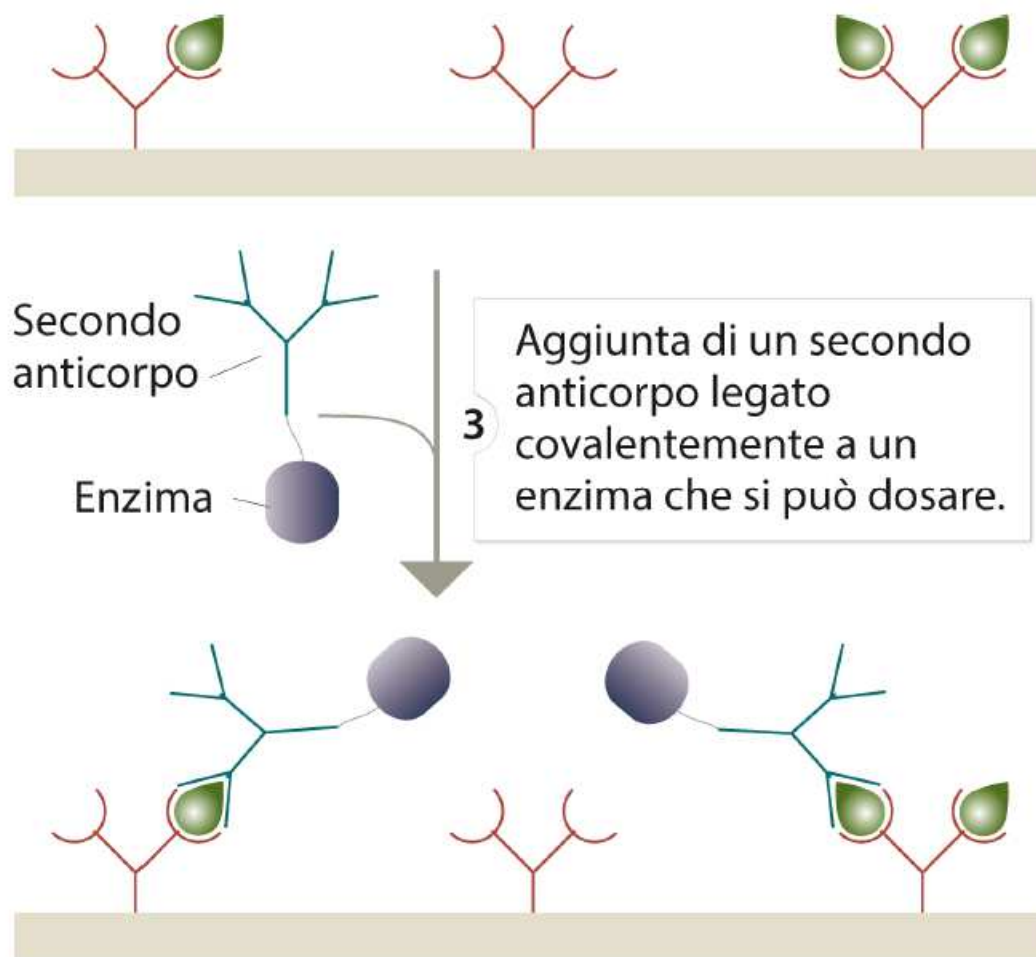




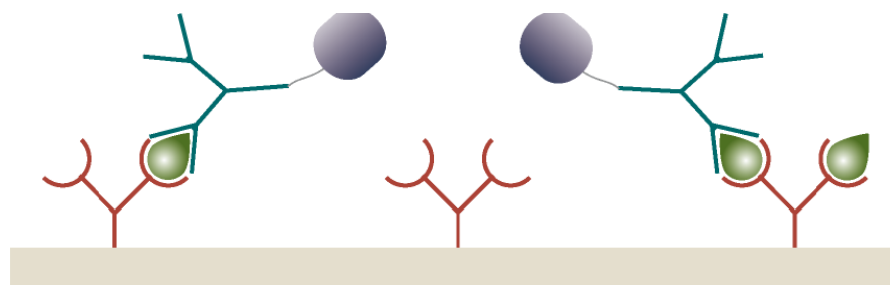
# Diagramma di processo del dosaggio ELISA



# Diagramma di processo del dosaggio ELISA



# Diagramma di processo del dosaggio ELISA

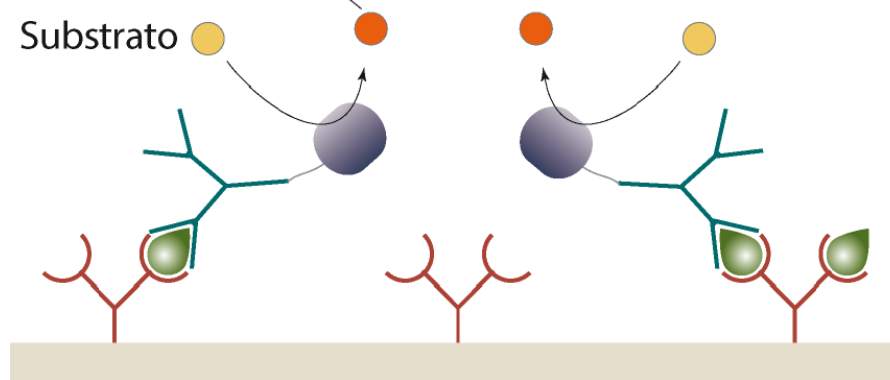


4

Lavaggio e dosaggio  
dell'attività dell'enzima.  
La quantità di substrato  
convertito in prodotto  
indica la quantità di  
proteina presente.

Prodotto rilevabile

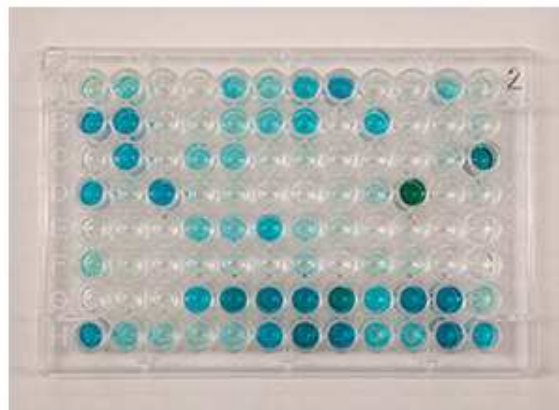
Substrato



## Dosaggio ELISA

Gli enzimi più comunemente usati sono la perossidasi di rafano (HRP) o la fosfatasi alcalina (AP).

I substrati enzimatici dovrebbero essere idealmente stabili, non tossici e poco costosi: substrati non colorati sono convertiti in prodotti colorati (es. OPD, arancio e TMB, blu).

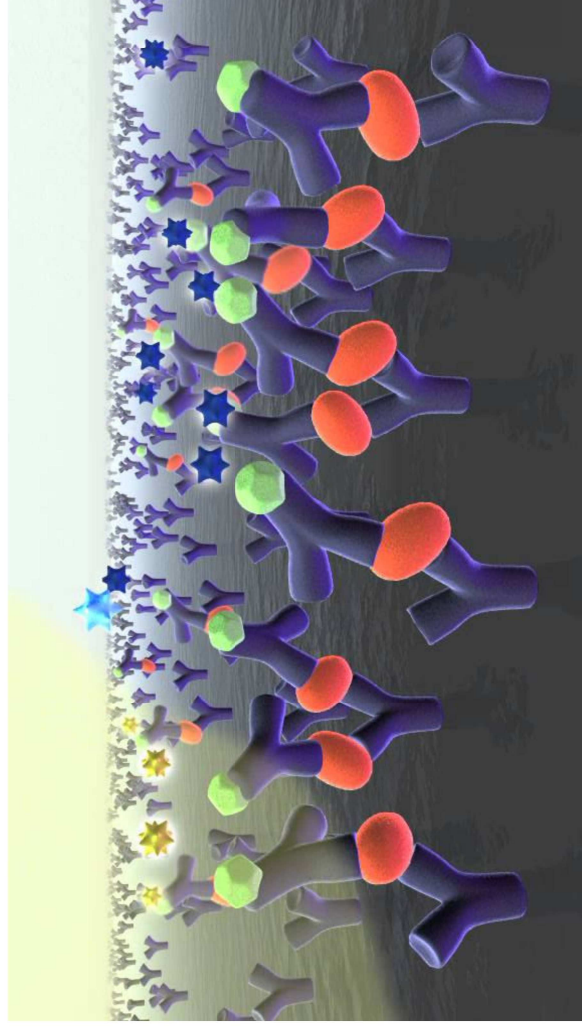




# Dosaggio ELISA

## Tipi di ELISA

- ➔ DIRETTO (Anticorpo primario marcato)
- ➔ INDIRETTO (Anticorpo secondario marcato)
- ➔ COMPETITIVO DIRETTO
- ➔ SANDWICH ELISA DIRETTO
- ➔ SANDWICH ELISA INDIRETTO





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# ALLERGENI ALIMENTARI



Sono alimenti o loro componenti che possono  
scatenare reazioni immuno-mediate.

(definizione dei legislatori e nell'uso comune)



# ALLERGENI ALIMENTARI

- La normativa comunitaria (**Reg. UE n. 1169/2011**) riconosce ufficialmente 14 allergeni alimentari.
- La legge prevede che si evidenzino gli allergeni presenti nella lista degli ingredienti.
- Salvo il caso del glutine, (che non è un allergene) non esistono concentrazioni minime sotto le quali un allergene è considerato assente.





# SCREENING DEGLI ALLERGENI

- **Screening sulla materia prima**

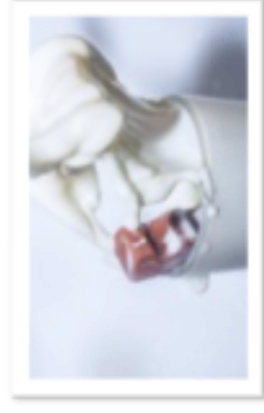
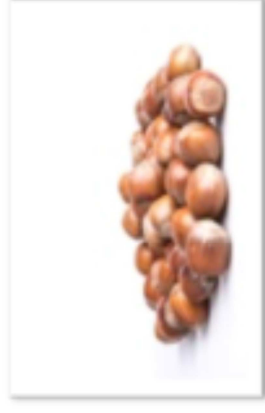
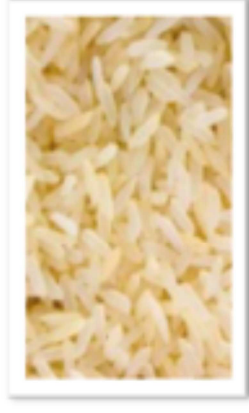
Es. Commercio di cereali: per produrre un alimento gluten-free si deve verificare che la partita di soia o riso acquistata sia conforme per il contenuto di glutine.

- **Screening di processo**

Es. Linea produttiva comune per merendine con nocciole e senza nocciole: è necessario verificare che la procedura di pulizia della linea sia efficiente. *(necessari tamponi di superficie)*

- **Screening sul prodotto finito**

Es. Linee produttive distinte nello stesso stabilimento producono alimenti che contengono latte e alimenti senza latte: è importante assicurarsi che non ci siano contaminazioni casuali.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# GLUTINE



**È un complesso proteico  
contenuto in molti cereali:  
FRUMENTO, ORZO, SEGALE,  
FARRO, KAMUT, ecc.**

**È composto da due proteine GLIADINA e GLUTENINA.**

**La GLIADINA è la proteina a cui la maggioranza delle  
persone sviluppa una reazione di intolleranza (CELIACHIA).**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# GLUTINE



**L'unica terapia ad oggi nota per la celiachia è la dieta senza glutine.**

**Indagini per verificare la tossicità delle tracce di glutine nei celiaci in trattamento, evidenziano come il limite di tossicità giornaliero di glutine assunto è inferiore a 10 mg.**

**L'utilizzo di prodotti a contenuto di glutine  $< 20$  ppm garantisce di non superare la soglia dei 10 mg di glutine al giorno**







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



**AIC**



**Europa**

# GLUTINE



- Per tutti i prodotti alimentari per i quali sia stata attestata l'idoneità al consumo da parte di celiaci, l'Associazione Italiana Celiachia ha registrato un marchio a tutela dei consumatori: la spiga sbarrata. Il simbolo, di proprietà dell'Associazione, viene concesso ai prodotti che abbiano contenuto di glutine inferiore a 20 ppm (secondo quanto indicato dalla Associazione e dal Ministero della Salute).
- Anche prodotti non italiani possono ottenere ugualmente il simbolo concesso dalle varie associazioni per i rispettivi territori di competenza, ma le modalità di certificazione sono diverse.
- In alcuni Paesi la spiga certifica un contenuto in glutine di 20 ppm, in altri si possono raggiungere anche 100 ppm.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# GLUTINE



Grazie anche alle evidenze scientifiche disponibili, dopo anni di discussioni nella comunità scientifica internazionale circa il limite massimo di glutine ammissibile in un alimento per poter essere considerato senza glutine, il Codex Alimentarius ha redatto, nel 2008, la revisione dello Standard sui prodotti alimentari per persone celiache.

Questo documento ha sancito definitivamente che un prodotto alimentare, per poter essere definito **“senza glutine”** non deve contenere più di 20 mg/Kg (o ppm = parti per milione) di glutine, quantitativo misurabile tramite la metodica ELISA con **anticorpo monoclonale R5**, metodo Mendez.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# GLUTINE



l'AOECS Standard for Gluten-Free Foods richiede l'uso di un sistema:

**ELISA a sandwich basato** sull' anticorpo R5 per l'analisi di glutine nella maggior parte dei prodotti alimentari – in conformità con il Codex standard.

**ELISA R5 competitivo** per alimenti fermentati o idrolizzati come birra, sciroppi o lievito madre.

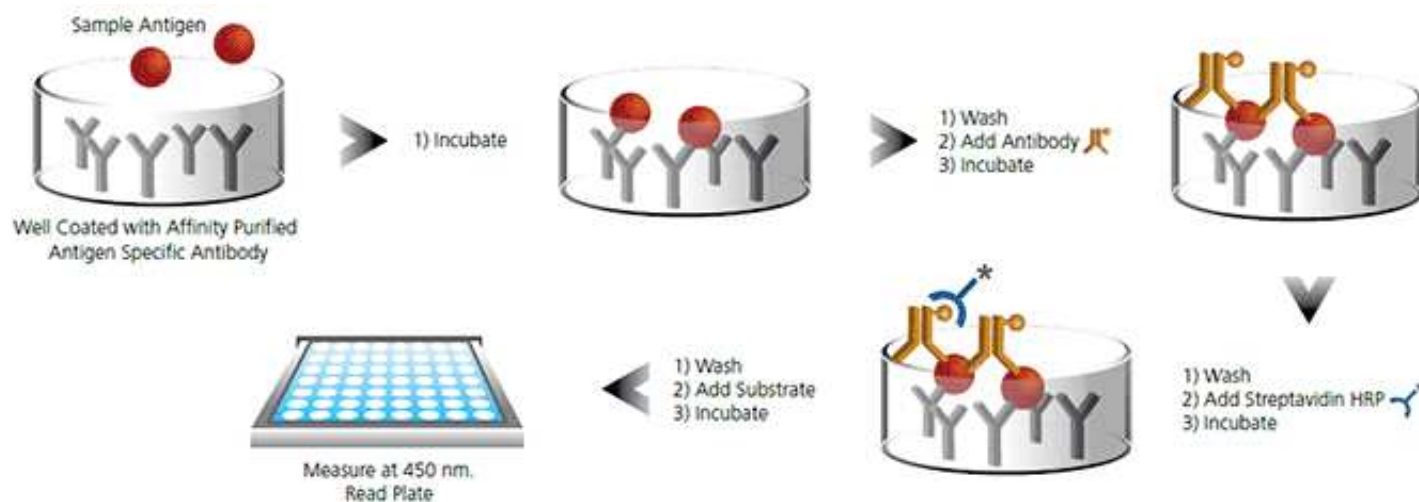
Il problema principale nell'analisi di glutine è la contaminazione da polvere di cereali presente in laboratorio. Pertanto, è di primaria importanza pulire il laboratorio con etanolo al 60% prima di iniziare l'analisi.





## Metodo SANDWICH ELISA DIRETTO

Questa metodica può essere utilizzata esclusivamente quando l'analita possiede almeno due epitopi. Un eccesso di anticorpo verso il primo sito antigenico viene immobilizzato sulla fase solida e incubato con diluizioni successive di antigene presente nel campione incognito.

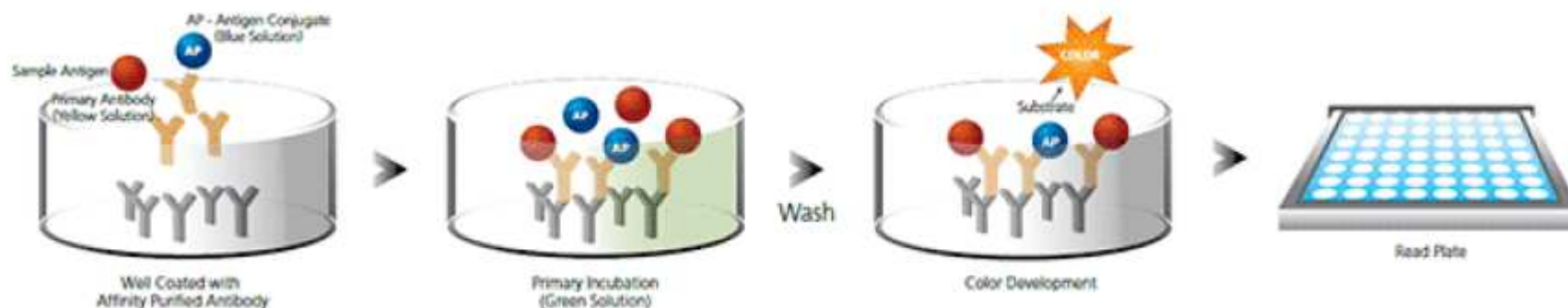


Dopo il lavaggio, il complesso AgAb immobilizzato viene incubato con una concentrazione fissa di anticorpo marcato che andrà a legarsi al secondo sito antigenico dell'immunocomplesso. La misura del prodotto della reazione enzimatica risulterà direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene da stimare.



# Metodo ELISA COMPETITIVO DIRETTO

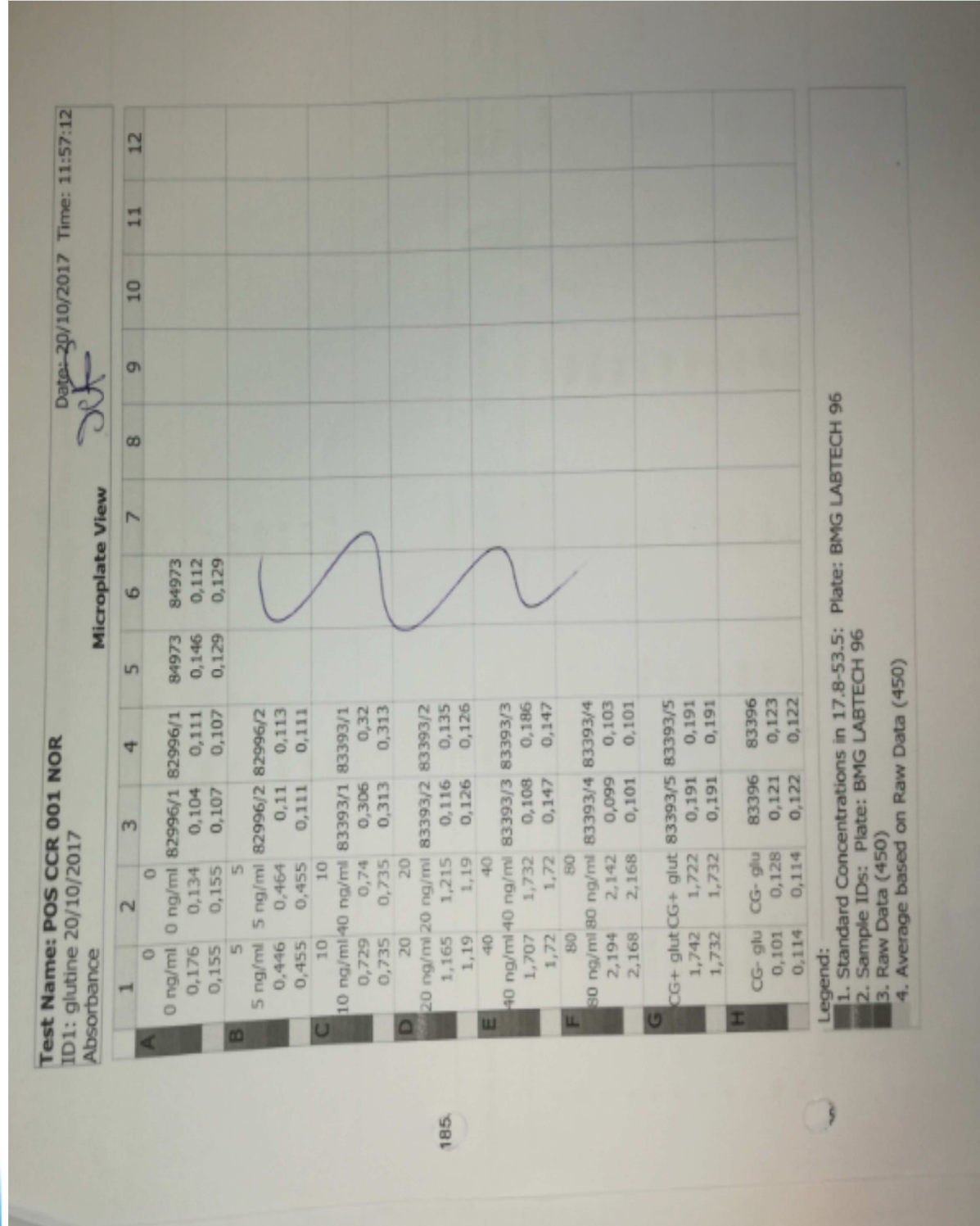
Una quantità fissa di antigene marcato (blu) e diluizioni decrescenti di antigene libero (come standard o nel campione, rosso) vengono messe a reagire insieme nei confronti di un anticorpo in difetto. In questo modo, l'antigene marcato e quello libero si troveranno a competere per un numero limitato di siti anticorpali.

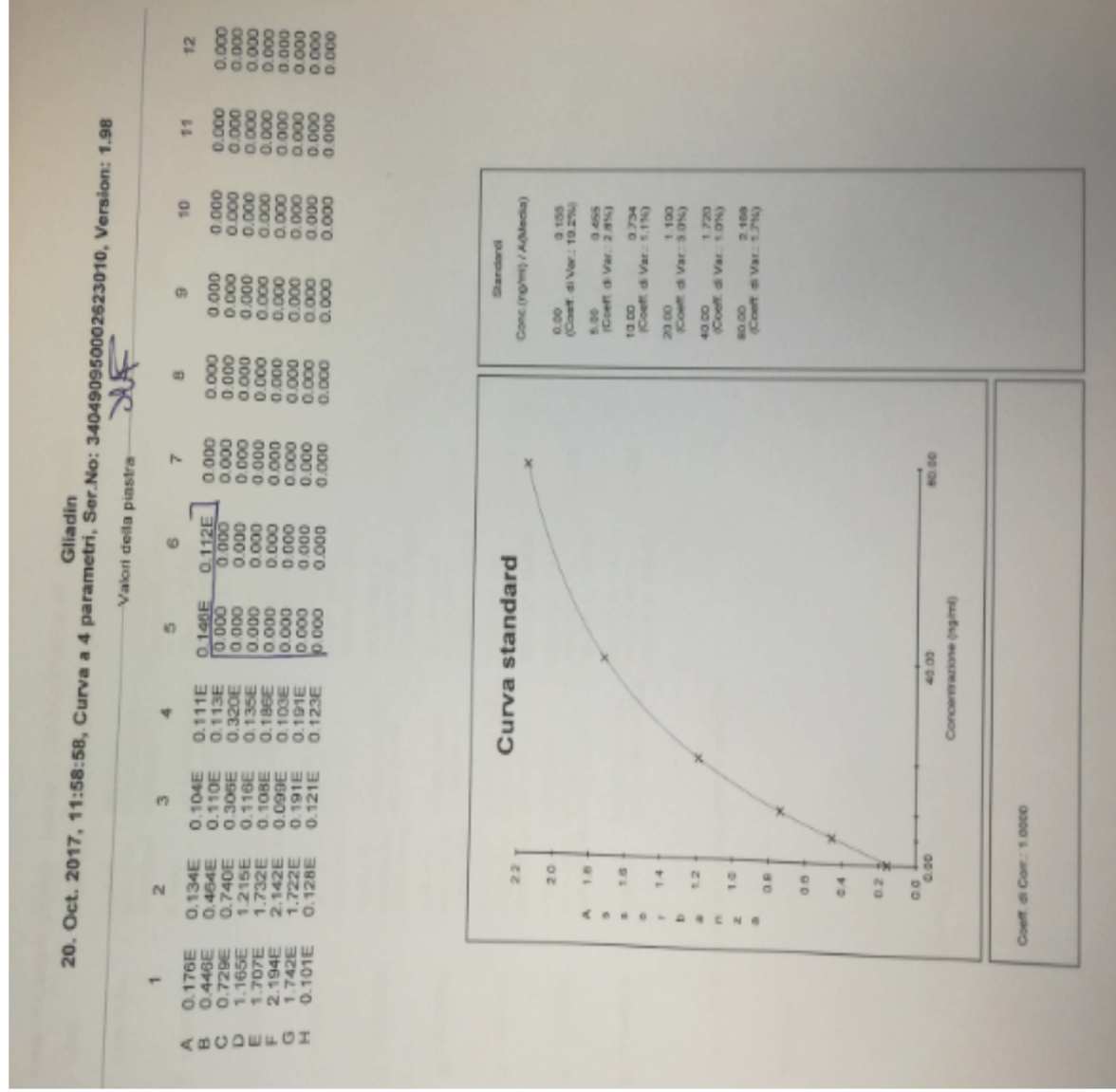


Dopo aver lavato il complesso, si aggiunge il substrato per l'enzima e si misura l'attività enzimatica. La concentrazione del prodotto enzimatico misurata risulterà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita (antigene non marcato).









20. Oct. 2017, 11:58:58, Curva a 4 parametri, Ser.No: 340490950002623010, Version: 1.98

# Gliadin

Numero di serie	Concentrazione ng/ml	Assorbanza (Media) (CV)	Standardi B/Bmax (%)
1	0.00	0.155E 19.2	7.1
2	5.00	0.455E 2.8	21.0
3	10.00	0.734E 1.1	33.9
4	20.00	1.190E 3.0	54.9
5	40.00	1.720E 1.0	79.3
6	80.00	2.168E 1.7	100.0

Numero di serie	ID	Assorbanza (Media) (CV) (%)	Campioni calcolato ng/ml	Fattore di	Gliadin mg/kg	Gluten mg/kg
1	cg +	1.732E 0.8 79.9	40.77 <b>OK</b>	500	20.39	40.77
2	cg -	0.115E 16.6 5.3	min	500		
3	82996/1	0.108E 4.6 5.0	min	500		
4	82996/2	0.112E 1.9 5.2	min	500		
5	83393/1	0.313E 3.2 14.4	2.81	500	1.41	2.81
6	83393/2	0.126E 10.7 5.8	min	500		
7	83393/3	0.147E 37.5 6.8	min	500		
8	83393/4	0.101E 2.8 4.7	min	500		
9	83393/5	0.191E 0.0 8.8	0.757	500	0.38	0.76
10	83396	0.122E 1.2 5.6	min	500		
11	84973	0.129E 18.6 6.0	min	500		





COMA Rapporto di Prova n. 1045/37  
Mater. resiste meccanica 17.000.000



N. 13 (D. G. L. Lazio 09/10/2015 n. 7025)  
N. 047 (L. A. Toscana 09/03/2006 n. 9)  
125 LT Sede Centrale  
Via Appia Nuova, 1411  
00178 ROMA  
Tel. 06/49811 - Fax 06/4981104

**OUTING MEMBERS**  
Tel: 0800 000 000 : Fax: 0800 000 000

**CIERRE S.R.L.**  
VIA DON LUIGI STURZO, 90  
52100 - AREZZO (AR)  
Alla direzione di: CIERRE S.R.L.

Sede di registrazione: 128, LT, Sezione di Arezzo.  
Data di nascita: 12/10/1937 alle ore 15:59.  
Dati anagrafici: ANNOCCI GIUSEPPE, nato a  
SERRAVALLE (AR) il 12/10/1937, figlio di  
RISIO AL. ROMANO e PIERO-ROS. L. L.,  
per un numero complessivo di 2 bambini.  
Indirizzo: via GIERRE S.R.L. in data 12/10/1937  
fondatore GIERRE S.R.L. (Ri 87735) - VIA DON LUIGI STURDO, 98 52100 AREZZO (AR)  
del genitore. Prolazione pubblica - RS2

inizio mese 30/10/2017 fine mese 30/10/2017

Campanini, corretto dalle prove 1-2

[illegible]

Il materiale in esame, prima delle prove, è stato conservato alle seguenti temperature:  
 FERRONATA 4100-01-17 (1)  
 CINGHIO 4100-01-17 (1)  
 CINGHIO 4100-01-17 (1)

**Responsabile delle prove**  
**Dr. ANTONELLA NARDONI**

Responsabile Struttura Complessa  
Direzione Operativa Produzione zootecniche  
Per lettera D. CRISTINA RIONCIONI

I campioni sono analizzati alla data di fine prova ed al termine di questi sottoposti a normali test specifici. I documenti relativi alla prova, sono conservati come prova della data di nascita a Vigonza. Il presente rapporto di prova riguarda esclusivamente il campione sottoposto alla prova, e non può essere rigettato come non valido, se non per motivi di natura tecnica. Il presente rapporto di prova riguarda esclusivamente il campione sottoposto alla prova, e non può essere rigettato come non valido, se non per motivi di natura tecnica. Il presente rapporto di prova riguarda esclusivamente il campione sottoposto alla prova, e non può essere rigettato come non valido, se non per motivi di natura tecnica.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

C:\Users\Laboria3\Desktop\ArchivioPC\ARCHIVIO generale\ANTO-Qualità\c  
orso 2017\Corso 2017 ok\Glutine\SuperQuark tagliato.mp4

