

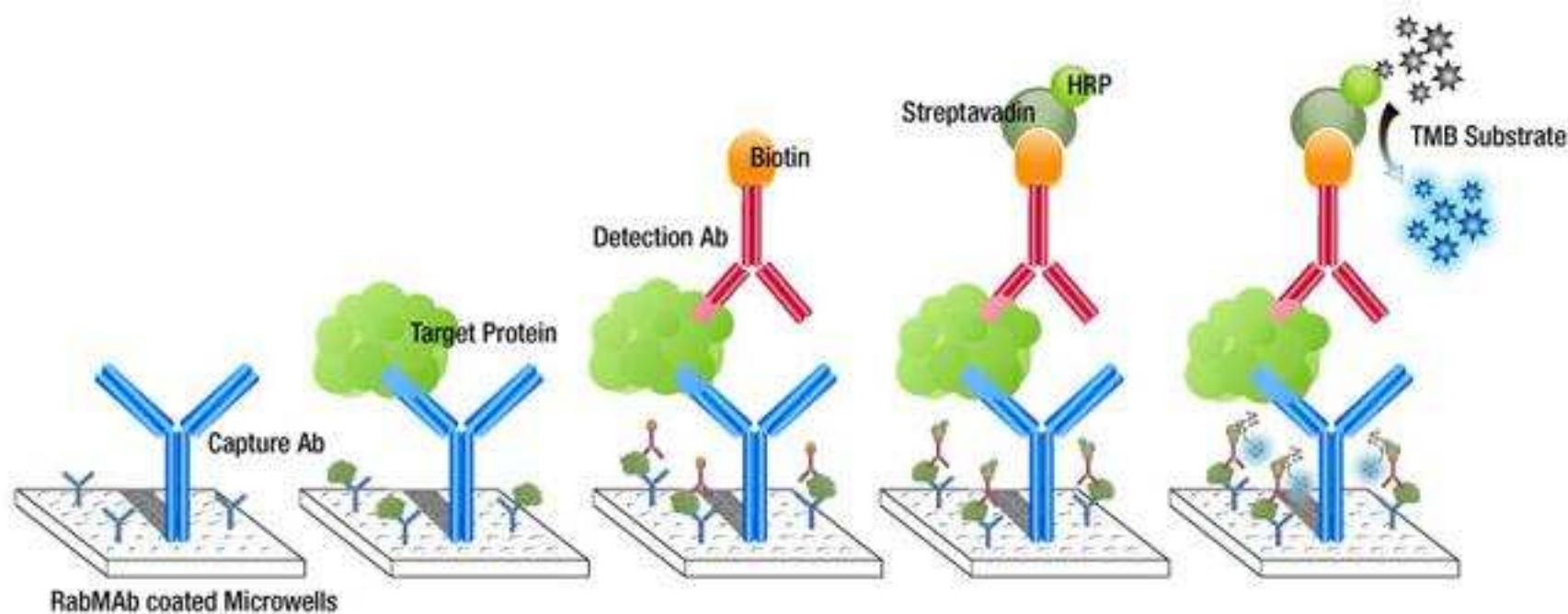


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

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;

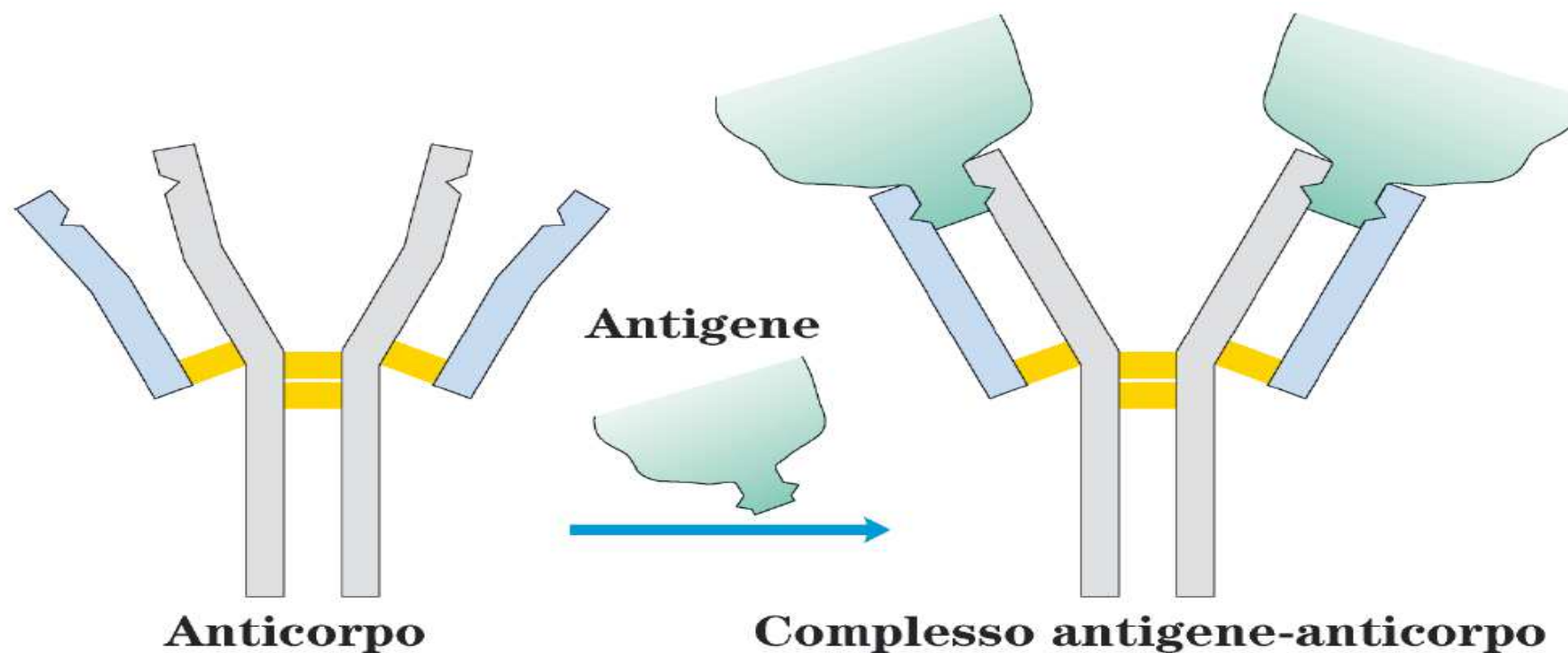
Degradabilità: macromolecole insolubili sono più immunogene di quelle più piccole e solubili, poiché vengono più facilmente fagocitate ed elaborate dal sistema macrofagico;

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).



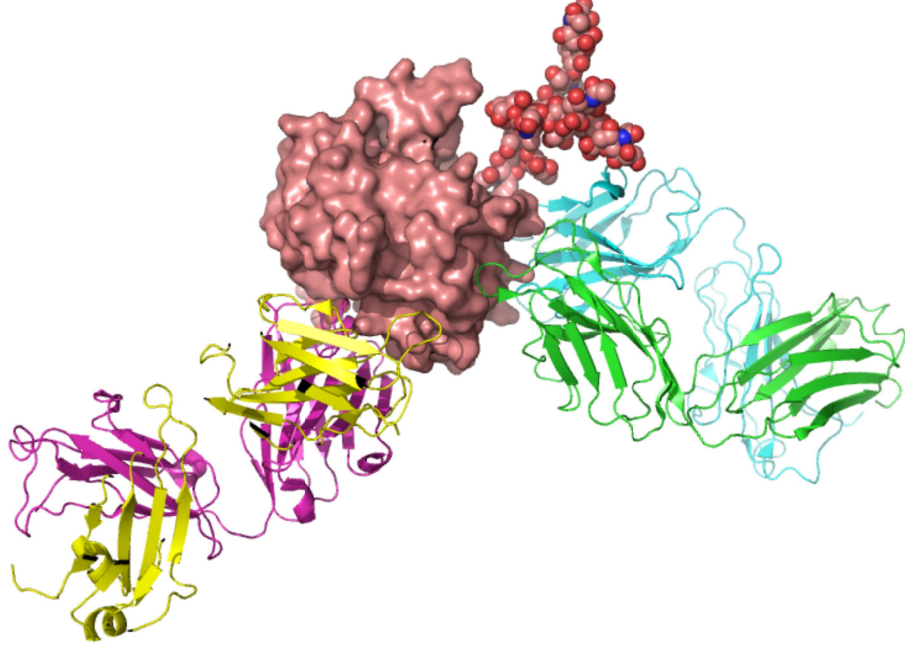
Legame antigene-anticorpo

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)

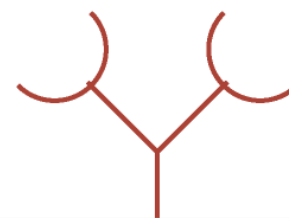
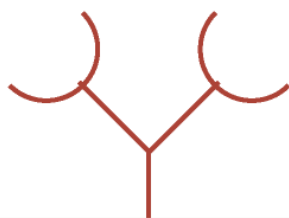
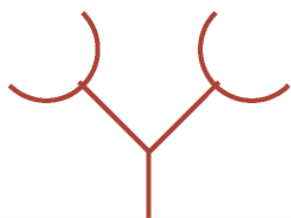
Indiretta
se l'Ag solubile, si fa adsorbire o
legare covalentemente a carrier
insolubili (e.g. sfere di lattice)



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

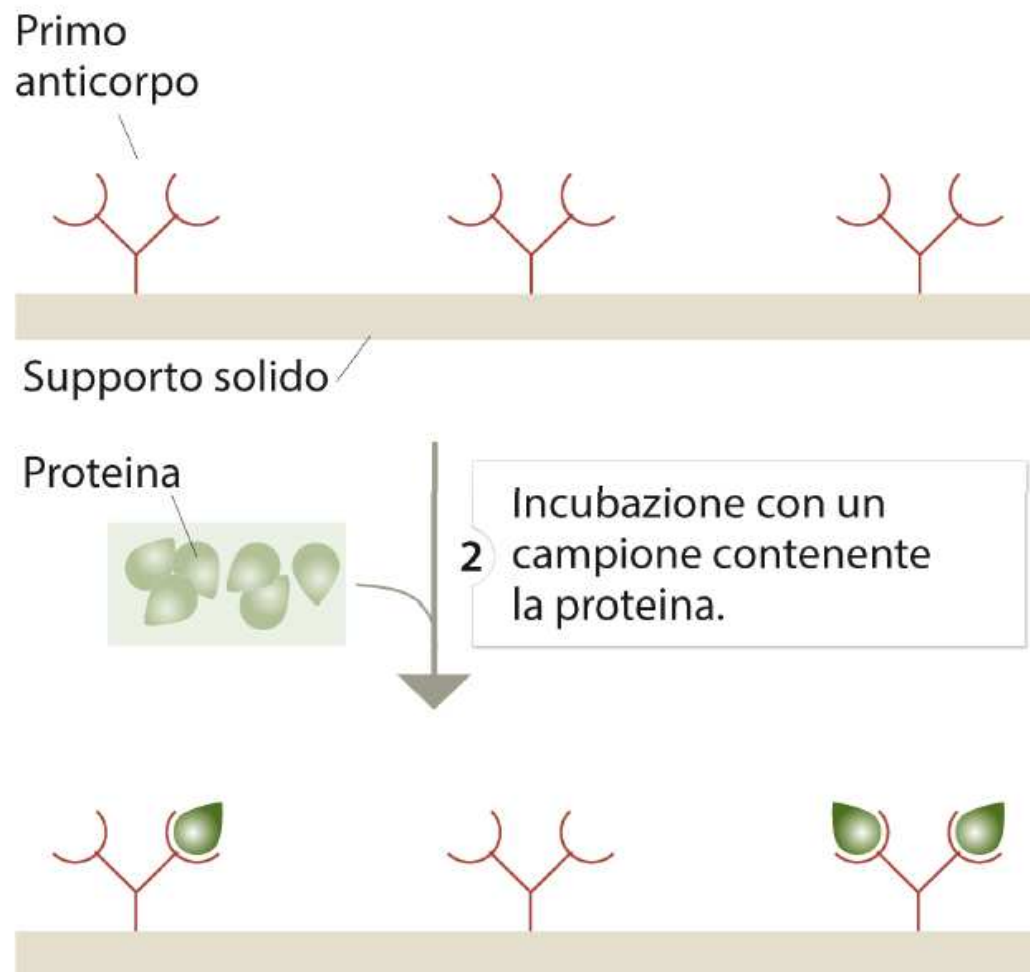


Diagramma di processo del dosaggio ELISA

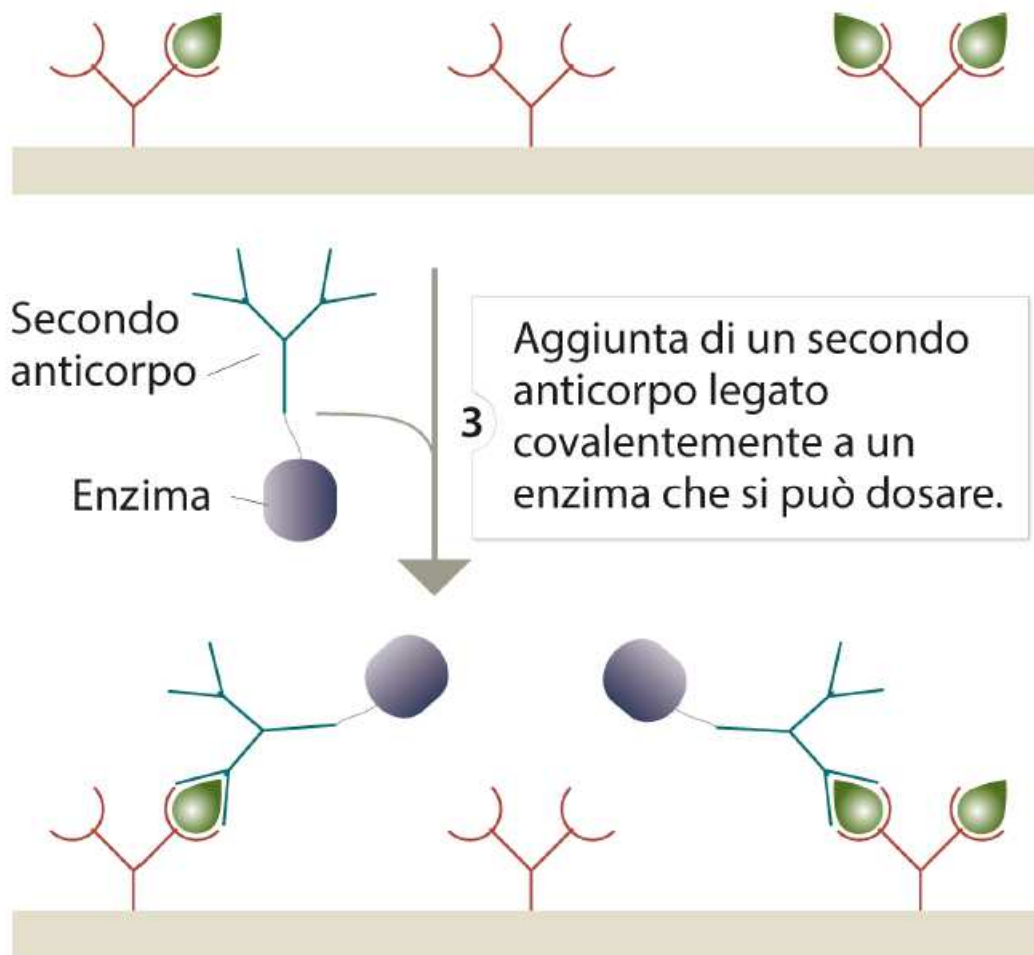
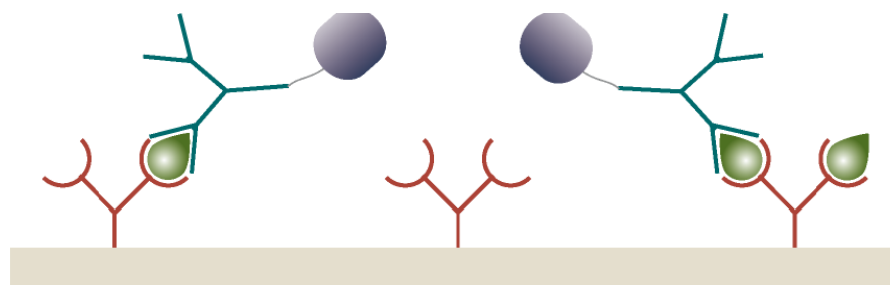


Diagramma di processo del dosaggio ELISA

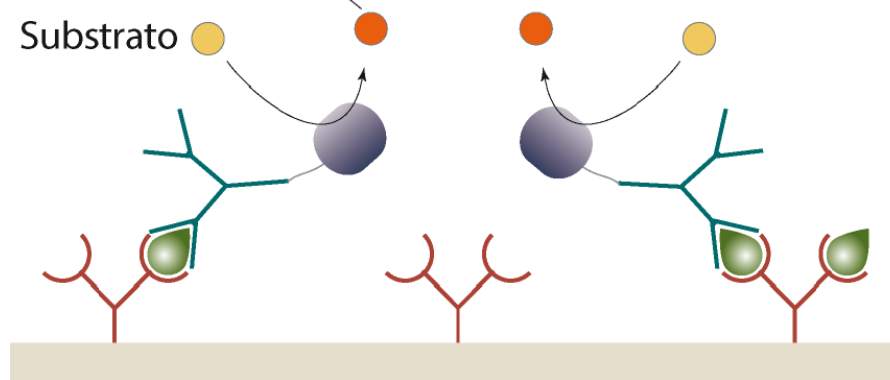


4

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

Prodotto rilevabile

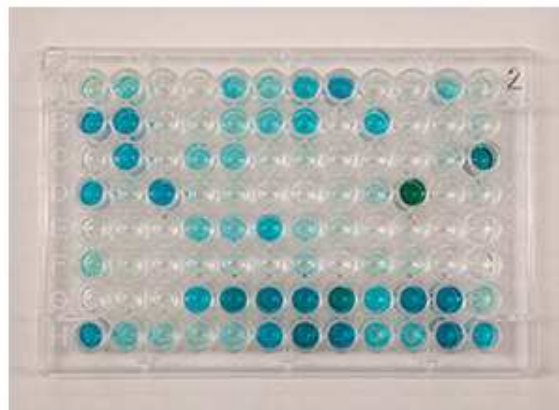
Substrato



Dosaggio ELISA

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

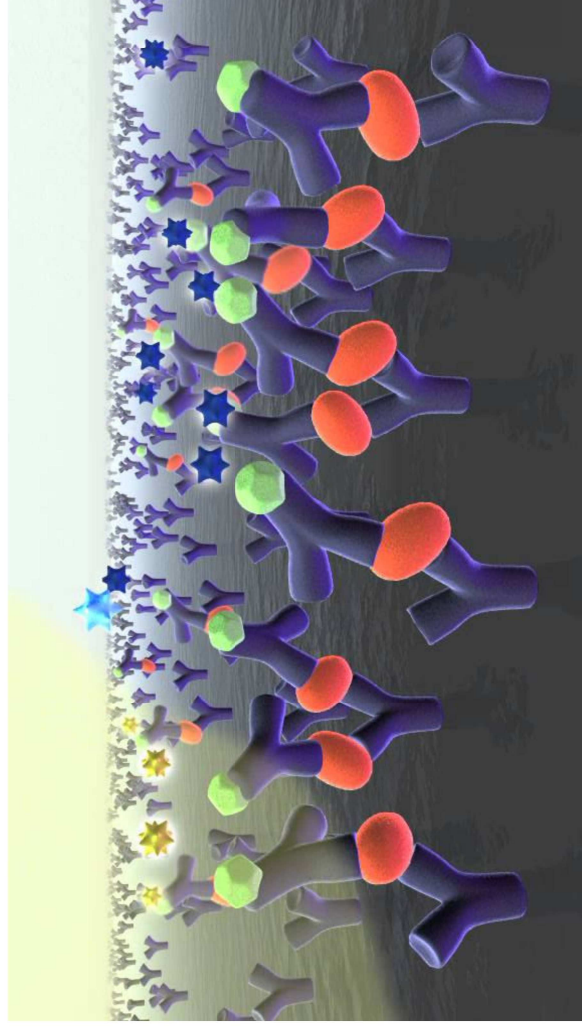
I substrati enzimatici dovrebbero essere idealmente stabili, non tossici e poco costosi: substrati non colorati sono convertiti in prodotti colorati (es. OPD, arancio e TMB, blu).



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**

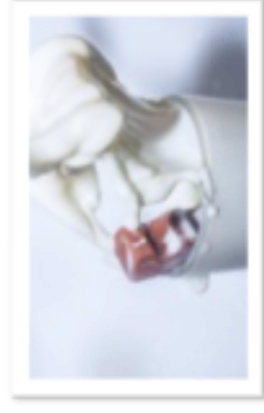
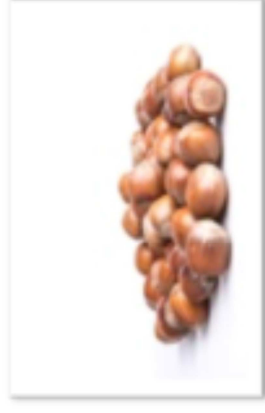
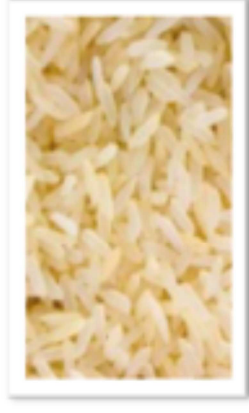
Es. Commercio di cereali: per produrre un alimento gluten-free si deve verificare che la partita di soia o riso acquistata sia conforme per il contenuto di glutine.

- **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.

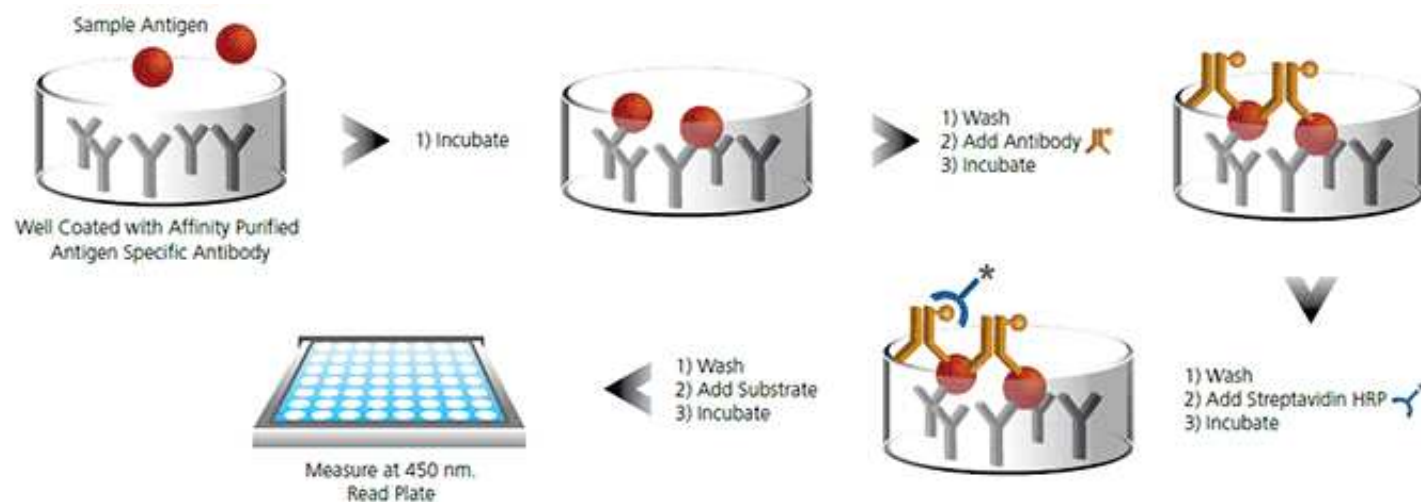
ELISA R5 competitivo per alimenti fermentati o idrolizzati come birra, sciroppi o lievito madre.

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.

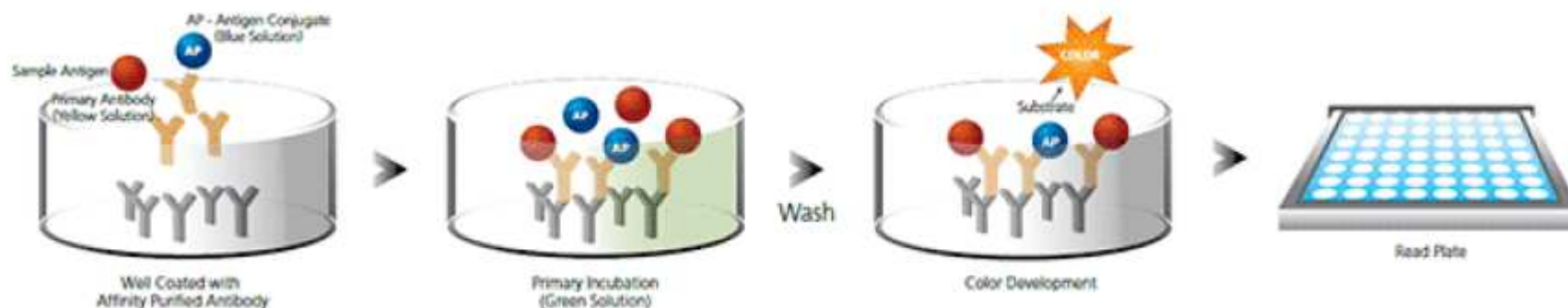


Dopo il lavaggio, il complesso AgAb immobilizzato viene incubato con una concentrazione fissa di anticorpo marcato che andrà a legarsi al secondo sito antigenico dell' immunocomplesso. La misura del prodotto della reazione enzimatica risulterà direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene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



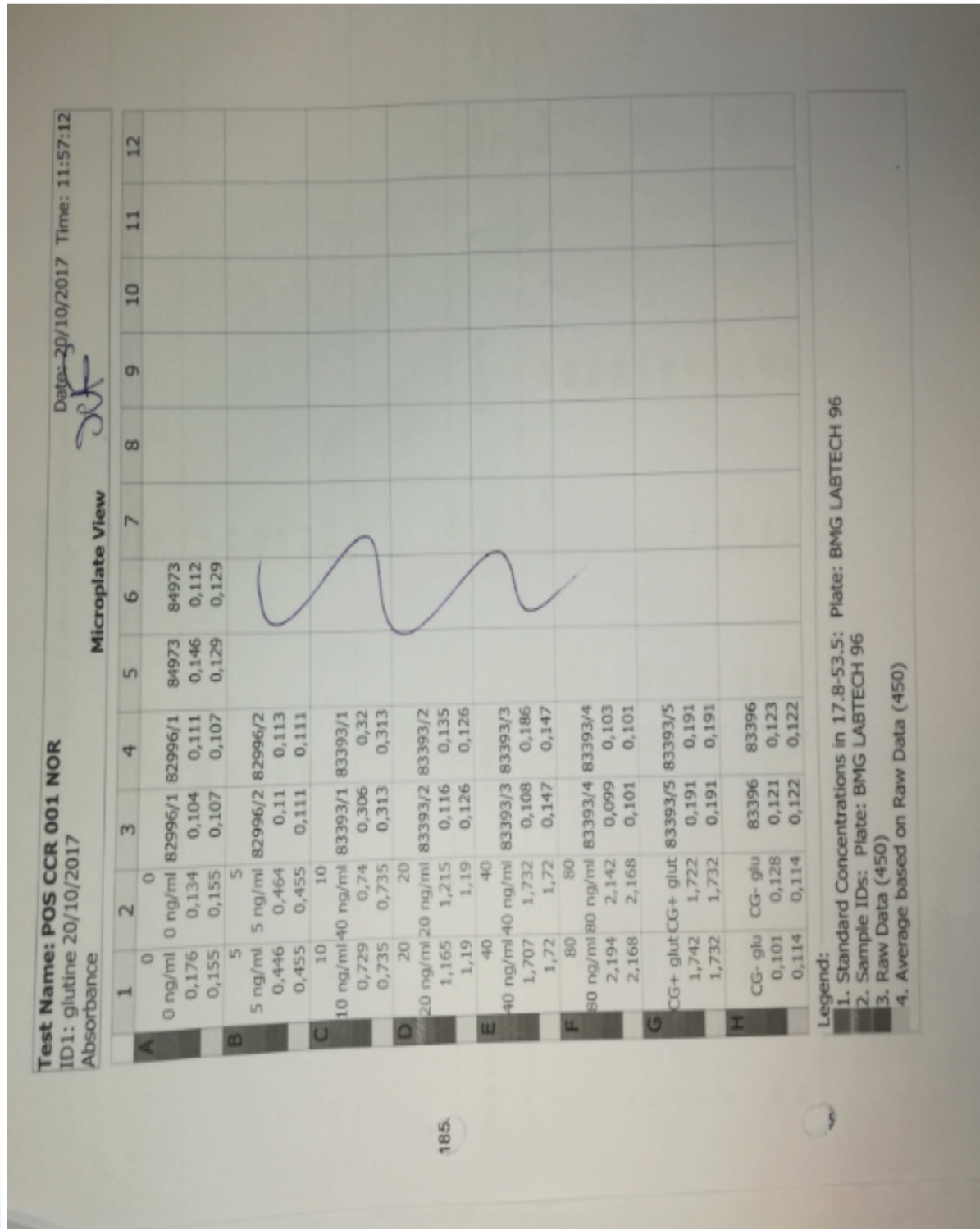
Metodo ELISA COMPETITIVO DIRETTO

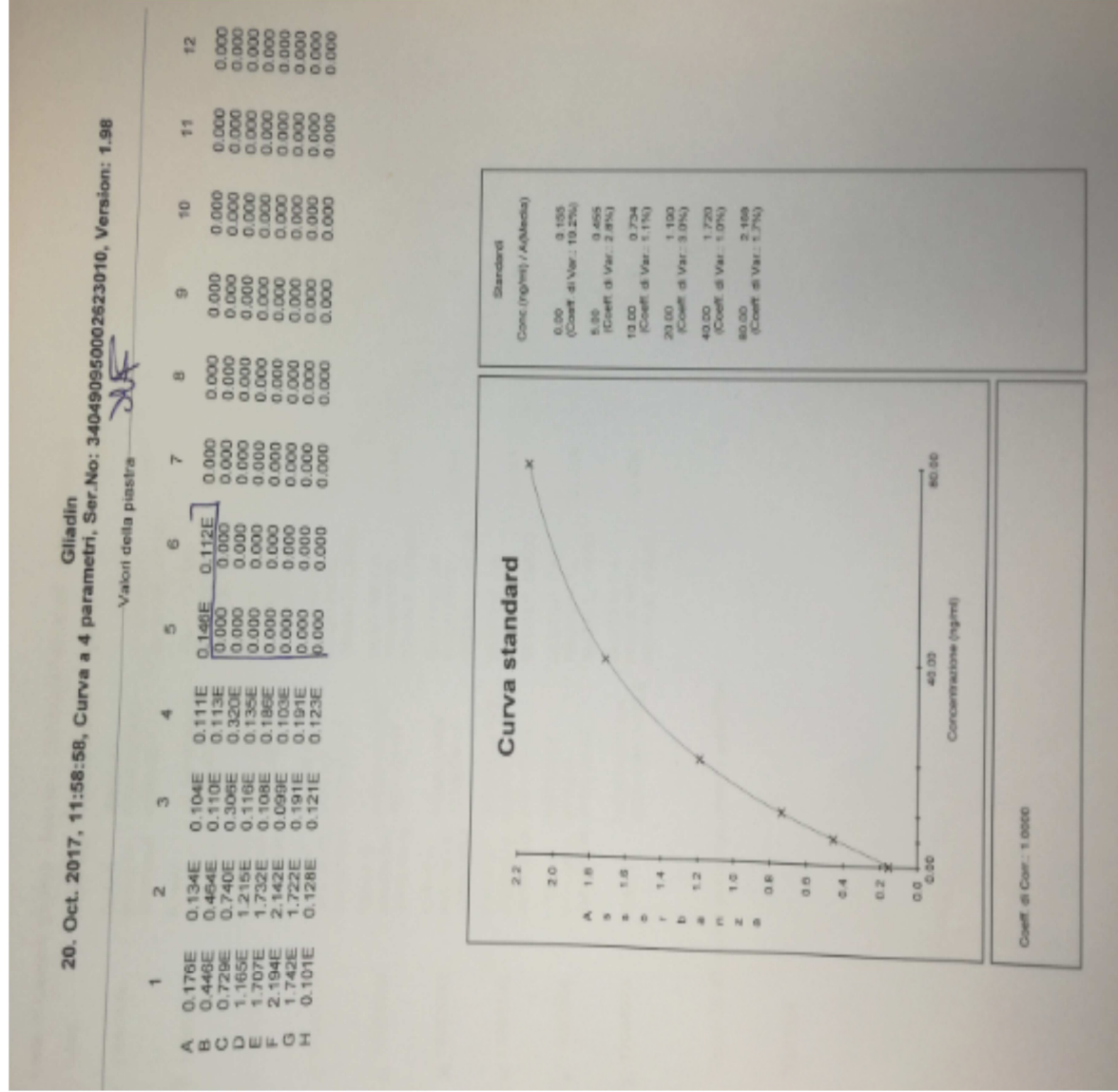
Una quantità fissa di antigene marcato (blu) e diluizioni decrescenti di antigene libero (come standard o nel campione, rosso) vengono messe a reagire insieme nei confronti di un anticorpo in difetto. In questo modo, l'antigene marcato e quello libero si troveranno a competere per un numero limitato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



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

MOD. 17 rev. 17
Copia Rapporto di Prova n. 1045231
Num. registrazione 1705596



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO Sperimentale
DEL LAZIO E DELLA TOSCANA

M. ALEANDRI
D.Lgs. 270/1963
D.Lgs. 106/2012

N. 13 (D. Gm. Lazio 06/10/2015 n. 7028)
N. 047 (D. Gm. Toscana 06/03/2006 n. 6)
Via Tuscolana 1555
00178 ROMA
Tel. 06/760681 - Fax. 06/76040724



LAB 107 201
Ministero degli Accordi di Mutuo Riconoscimento (M.A.R.)
S.M.C.
Signatory of EA, per and S.M.C. Mutual Recognition
Agreement

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

Sede di accreditazione IZS LT Sezione di Arezzo
Destinazione dei campioni pervenuti in data 10/10/2017 alle ore 10:50
PEPERONATA 4100-01-17: n.1 campione composto da n.1 aliquota a temp. T° Rilevata +7,9°C
RISO AL POMODORO 4100-02-17: n.1 campione composto da n.1 aliquota a temp. T° Rilevata +7,9°C
per un numero complessivo di 2 campioni.
prelevato da CIERRE S.R.L. in data 10/10/2017
destinato a CIERRE S.R.L. (PI 81738) - VIA DON LUIGI STURZO, 90 52100 AREZZO (AR)
luogo del prelievo: Razione pubblica - B52

Inizio prove: 20/10/2017 fine prove: 20/10/2017

Campioni oggetto delle prove: 1-2

RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE			
RISO AL POMODORO 4100-02-17			
PROVA: GLUTINE DA FRUMENTO, SEGALE, ORZO - TECNICA: ELISA			
Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.
2	1	1	Edito
INFERIORE AL LIMITE DI RILEVABILITÀ			
PEPERONATA 4100-01-17			
PROVA: GLUTINE DA FRUMENTO, SEGALE, ORZO - TECNICA: ELISA			
Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.
1	1	1	Edito
INFERIORE AL LIMITE DI RILEVABILITÀ			
Procedimento			
GLUTINE DA FRUMENTO, SEGALE, ORZO			
(ELISA) RISO AL POMODORO 4100-02-17			
Metodo di Prova			
ACAC Berlin			
GLUTINE DA FRUMENTO, SEGALE, ORZO			
(ELISA) PEPPERONATA 4100-01-17			
Metodo di Prova			
ACAC Berlin			

Il risultato in esame, prima delle prove, è stato conservato alle seguenti temperature:
REFRIGERATA 4°C/8°C (1)
Congelato
RISO AL POMODORO 4100-02-17 (1)

Responsabile delle prove Dr. ANTONELLA NAPOLINI	Responsabile Struttura Complessa Direzione Operativa Produzione zootecnica Per delega Dr. CRISTINA ROMANONI
--	---

I campioni sono eliminati alla data di fine prova ad eccezione di quelli sottoposti a normativa specifica. I documenti relativi alla prova sono conservati come previsto dalla normativa vigente. Il presente rapporto di prova riguarda esecuzioni a prova, e non può essere riprodotto parzialmente, salvo approvazione scritta dell'Istituto. Il laboratorio è responsabile del campionamento ed o m e effettuato dallo stesso (PI) MIC 007 (Rosa





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

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

