

Development of nanotechnological methods (biosensors) to detect hidden allergens in animal and vegetable origin food. (RF-IZP-2008-1160478)

La ricerca nel suo complesso ha permesso il raggiungimento degli obiettivi fissati al momento della stesura del progetto.

Dal punto di vista analitico, è stato prima di tutto effettuato un censimento dei metodi esistenti in commercio al momento dello svolgimento delle attività stesse e potenzialmente utilizzabili per il controllo della presenza di allergeni in campioni alimentari. Di questi sono state indagate le caratteristiche tecniche, analitiche e di impiego relativamente sia a performance in termini di validazione del protocollo che in termini di praticità per gli operatori. Questa indagine ha permesso di avere una prima rosa di test utilizzabili dai laboratori che effettuano Controllo Ufficiale sugli alimenti.

La partecipazione al progetto di 9 laboratori ufficiali che effettuano il controllo degli alimenti ha permesso di effettuare un importante circuito interlaboratorio che ha delineato le caratteristiche tecniche dei test precedentemente individuati. L'elaborazione dei risultati analitici insieme con la verifica dell'applicabilità in un laboratorio ufficiale ha permesso di individuare kit che meglio rispondono alle esigenze dei laboratori.

Il progetto ha permesso di investigare due metodi alternativi alle metodiche classiche impiegati per la determinazione di allergeni in alimenti: la citofluorimetria e la tecnica cantilever.

La prima tecnica ha dato ottimi risultati in termini di sensibilità, tuttavia il costo elevato di una singola prova e il protocollo laborioso non lo rendono adatto per l'impiego in routine presso laboratori che effettuano quotidianamente un elevato numero di analisi. Il suo impiego potrebbe essere giustificato dalla sua capacità di detectare, in un unico saggio, la presenza di più target (allergeni) utilizzando sistemi specifici di rilevazione marcati con fluoro cromi diversi.

La tecnica cantilever (nano biosensori meccanici) è stata messa a punto sia per la determinazione di beta caseine che di betalattoglobuline. Nel primo caso il protocollo si è rivelato poco sensibile: il limite di rilevazione (LOD) che il metodo può raggiungere è infatti pari a 7.5 ppm. Nel secondo caso invece i risultati sono stati molto soddisfacenti, poiché il protocollo messo a punto e ottimizzato ha raggiunto un LOD di 0.1 ppm e si è dimostrato ripetibile. Pertanto la tecnica cantilever ha mostrato possedere caratteristiche tecniche adeguate per il controllo ufficiale. Al momento tuttavia, l'esistenza di un solo prototipo strumentale per l'esecuzione delle analisi mantiene elevato il costo elevato dell'analisi.

La PCR digitale è un metodo innovativo, non ancora presente sul mercato al momento della stesura del progetto, ma che è stata testata in quanto consente di effettuare una quantificazione assoluta del DNA codificante la proteina allergenica presente in un alimento. Sono pertanto state effettuate delle prove preliminari per valutare l'applicabilità di tale tecnica alla ricerca di DNA di crostacei utilizzando protocolli e test di due diverse ditte produttrici. Solo uno dei due kit ha dato risultati soddisfacenti: il controllo positivo di gambero ha mostrato un titolo molto vicino a quello teorico atteso e quelli negativi non hanno mostrato segnali rilevabili. I campioni fortificati e il controllo hanno mostrato una ottima linearità e il limite di rilevazione del sistema è risultato essere di almeno 5 ppm.

Il progetto ha permesso di mettere a punto un protocollo in LC-MS/MS come metodo di conferma di secondo livello: il metodo si basa sull'identificazione specifica di peptidi delle proteine dell'allergene in esame (latte, uova) e prevede che sia applicato a campioni riscontrati positivi con tecniche ELISA. Tutti i livelli di contaminazione preparati sono stati confermati; i dati analitici hanno permesso di creare una retta di taratura che è stata impiegata per analizzare anche nuovi campioni creati in laboratorio o reperiti in commercio. Il metodo si è mostrato robusto e applicabile come metodo di conferma di secondo livello su campioni risultati positivi ai metodi tradizionalmente impiegati.

I campionamenti effettuati dalle unità operative hanno permesso di ottenere dati sulla presenza di allergeni non dichiarati in etichetta: la vasta attività di campionamento ha permesso di individuare le tipologie di alimento maggiormente a rischio per la presenza di allergeni. Nei campioni analizzati in Italia sono state riscontrate le seguenti positività: 0,64% per il glutine (N=628), 2,17% per la β -lattoglobulina (N=968), 8,47% per l'uovo (N=874), 1,84% per i crostacei (N=163), 30,4% per il sedano (N=23) e 4,79% per le caseine (N=167).

Le attività di verifica nelle aziende hanno portato le UO coinvolte in questo WP a definire il rischio di cross contaminazioni durante i processi produttivi.

L'IZS LER ha riscontrato la presenza di contaminazione ambientale per l'allergene glutine, all'interno di un'azienda produttrice di pasta secca. Tale azienda non possiede linee produttive separate e la valutazione dei punti di maggior rischio di contaminazione (Critical Control Point) ha permesso di evidenziare delle criticità del sistema.

L'IZS PLV ha rilevato la presenza dell'allergene nocciola, non dichiarato in etichetta, in un prodotto finito a base di pistacchio (biscotti). I tamponi ambientali effettuati presso l'azienda sono risultati tutti negativi. Pertanto la contaminazione non è riconducibile all'ambiente ma è presumibilmente ascrivibile ad altre fonti. Inoltre l'analisi delle materie prime impiegate per la preparazione dei biscotti ha dato esito negativo.

Le attività correlate alla comunicazione del rischio hanno permesso di fornire elementi decisivi per modificare l'approccio alla comunicazione scientifica quando questa è indirizzata a un target non ancora sufficientemente coperto da campagne informative, in riferimento soprattutto all'argomento allergie e intolleranze alimentari. E' stata riscoperta e utilizzata con successo una tra le più antiche tecniche (medium) di comunicazione: il teatro. Il percorso fatto con i docenti prima e poi con i discenti ha sicuramente portato a significative modifiche di atteggiamenti e di comportamento dei bambini, confermando questo approccio come valido per un suo impiego più ampio nella comunicazione del rischio su tematiche di sanità pubblica veterinaria