

Quale ricerca per stimolare la Normativa e per favorire la chiarezza dell'etichettatura a tutela del consumatore?

Rosangela Marchelli

EFSA- NDA Panel

Università di Parma

Torino 9 novembre 2012

Regulatory Science

- Dalla ricerca di base.....
- alla valutazione del rischio.....
- al management del rischio.....
- alla comunicazione del rischio.

Valutazione del rischio (Risk Assessment)

- **Hazard**: la capacità intrinseca di una sostanza di produrre una reazione avversa
 - identificazione dell'hazard (allergene)
 - caratterizzazione dell'hazard (allergene)

Esposizione all'hazard
(Dose-risposta)

- **Caratterizzazione del Rischio**: valutazione della probabilità che si verifichi un effetto avverso a seguito dell'esposizione all'hazard

European Food Safety Authority (EFSA)

EFSA is the **EU risk assessment body** for food and feed safety.

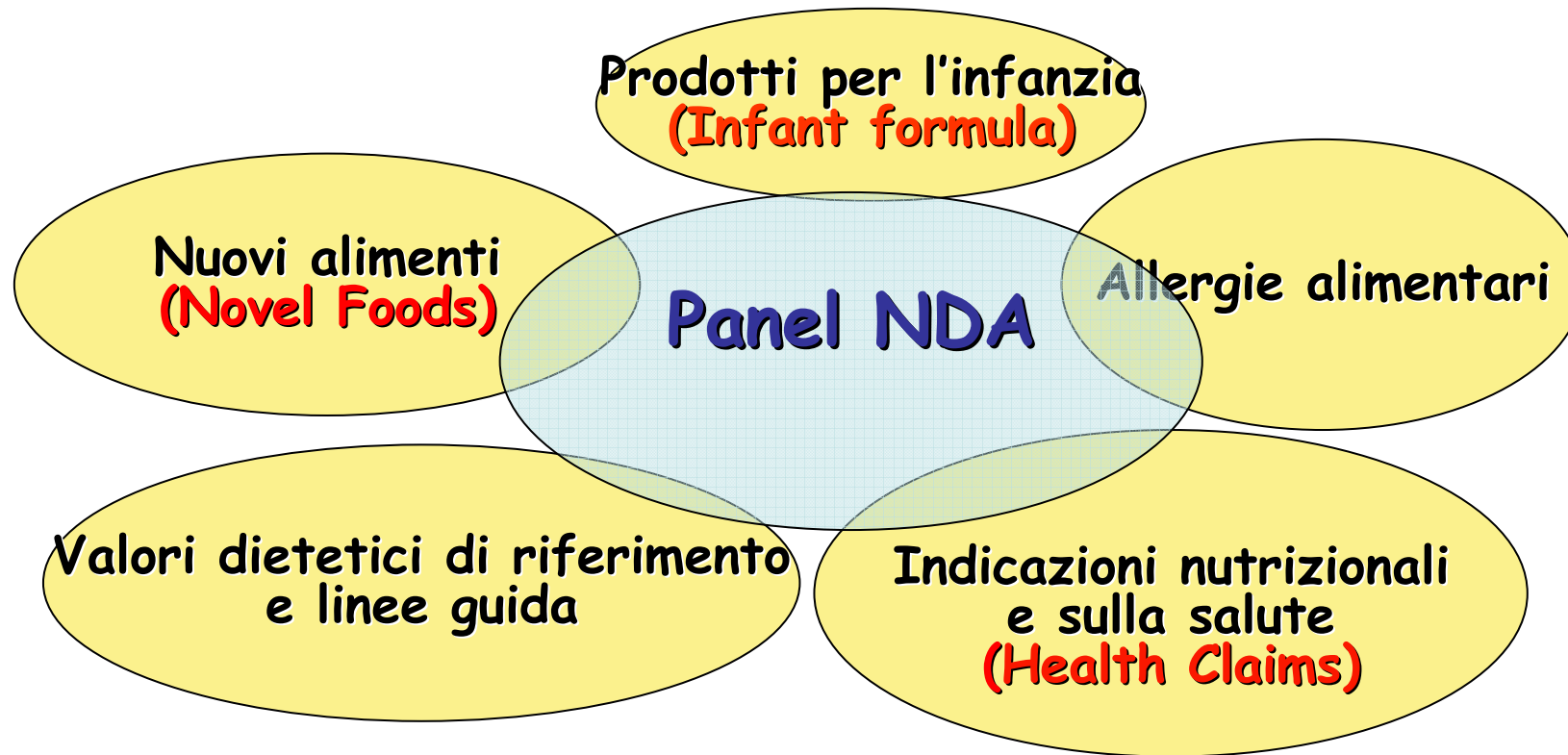
It provides **independent scientific advice** to risk managers.

EFSA

- EFSA formula **opinioni** basate sulle più recenti metodologie scientifiche, le informazioni e i dati disponibili.
- Le opinioni scientifiche di EFSA forniscono solide basi per le politiche e la legislazione Europee e **sono di supporto per i risk managers** nel prendere decisioni efficaci e tempestive.
- A supporto delle **attività di valutazione del rischio**, EFSA lavora anche per armonizzare le metodologie e le pratiche per la valutazione del rischio in Europa, consolidare le collezioni di dati e analisi europee, promuovere la cooperazione scientifica tra gli Stati Membri, e identificare i rischi emergenti associati alla catena alimentare.

NDA (Nutrition, Dietetics and Food Allergy) Panel

Sicurezza



Valutazione della fondatezza scientifica

Legislazione europea

- **Direttiva 2000/13/EC** : relativa all'etichettatura, presentazione e pubblicizzazione dei prodotti alimentari
- **Direttiva 2003/89/EC** amending Dir. 2000/13/EC
Annex IIIa riporta la Lista degli ingredienti allergenici da dichiarare in etichetta
- **Direttiva 2006/142/EC** aggiunge il **lupino** e i **molluschi** alla Lista riportata nell'Annex IIIa
- **Direttiva 2007/68/EC** riporta le **esenzioni dall'etichettatura**

Annex IIIa: ingredienti da dichiarare in etichetta

- Cereali contenenti glutine e prodotti derivati
 - Crostacei
 - Uova
 - Pesce
 - Arachidi
 - Soya
 - Latte
 - Frutta a guscio
- Sedano
Senape
Semi di Sesamo
Molluschi
Lupino

Anidride solforosa e solfiti a concentrazioni superiori a 10 mg/Kg o 10 ml/L, espressi come SO₂

•

PROBLEMATICHE APERTE

- **Epidemiologia** delle allergie alimentari: incidenza e diffusione
- **Allergeni emergenti**
- Influenza di **fattori genetici, geografici o ambientali**
- **Meccanismi** dell'insorgenza dell'allergia
- **Struttura degli allergeni** (epitopi, struttura tridimensionale, ecc.)
- Influenza del **processo tecnologico o della cottura** sull'allergenicità di una proteina, **effetto matrice**
- **Metodi di analisi**
- **Allergeni nascosti/contaminazione accidentale**
- **Valori soglia, LOAEL, NOAEL, MOED, MED**

Epidemiologia

- **EFSA Tender 2012:** Literature searches and reviews related to the prevalence of food allergy in Europe.
- Allergeni emergenti

Influenza di fattori genetici, geografici e ambientali

- Abitudini alimentari
- Stili di vita (esercizio fisico, alcol, farmaci, ecc.)
- Fattori genetici :
 - - atopia,
 - - **geni specifici di risposta immunitaria**
 - - interazioni gene-ambiente
 - - interazioni gene-gene
 - - epigenetica
- Fattori geografici-etnici
- Fattori ambientali

Struttura degli allergeni

- Struttura primaria (PM, epitopi lineari)
- Struttura secondaria (epitopi conformazionali)
- Struttura terziaria tridimensionale 3D
- Cross-reactivity
- **Banche dati**
- **Strumenti bioinformatici**
- **Spettrometria di massa, NMR, raggi X**
- Digeribilità (peptidi)
- Alterazione strutturale per trattamento tecnologico e cottura
- Aggregazione di peptidi e proteine
- Effetto matrice

Influenza dei trattamenti tecnologici e cottura

- Processi termici
- Alte pressioni
- Processi di conservazione tradizionali (salamoie, ecc.)
- Fermentazioni
- Processi idrolitici
- Processi enzimatici
- Nanofood
- GMO

Modificazioni indotte da trattamenti termici

- **Modificazioni fisico-chimiche**
 - -unfolding della proteina
 - -perdita della struttura secondaria
 - -rottura dei ponti disolfuro
 - -formazione di nuovi ponti disolfuro
 - -formazione di nuove interazioni inter/intramolecolari
 - -formazione di aggregati

Modificazioni chimiche

- Reazioni di Maillard
- Cross-linking : formazione di isopeptidi, lisino-alanina, ecc.
- Deamminazione di asparagina
- Reazioni ossidative
- Reazione con lipidi ossidati
- Reazioni con polifenoli in alimenti di origine vegetale
- Scrambling dei ponti a disolfuro

Requisiti dei metodi di determinazione degli allergeni

- Specificità
- Sensibilità– Quanto? (down to nothing ?)
- Determinazione simultanea di più allergeni
- Metodi quantitativi
- Rapidità
- Disponibilità/costi

- Metodi di **screening**
- Metodi di **conferma**
- **Validazione dei metodi**

Metodi per la determinazione di allergeni alimentari



Determinazione **diretta**
delle **proteine** allergeniche

Determinazione indiretta
degli ingredienti allergenici
mediante analisi del **DNA**

Metodi immunochimici (ELISA, ecc)
Metodi Separativi (SDS-PAGE, LC, ecc.)
Spettrometria di Massa
Microarrays

Real Time PCR
Microarrays
End-point-PCR
PCR-free methods

Metodi immunologici per la determinazione delle proteine allergeniche alimentari

(A.J. Van Hengel, Anal. Bioanal. Chem., 2007)

• Methods	Specificity achieved by	Target analyte	LOD/LOQ
• RAST/EAST	Human IgE binding	Allergenic proteins	1 mg/kg
• Immunoblotting	Binding to human IgE or antibodies from anim.	Proteins	2.5–5 mg/kg
• Rocket immuno-electrophoresis	Binding to human IgE or antibodies from anim.	Proteins	2.5–30 mg/kg
• ELISA	Binding to human IgE or antibodies from anim.	Proteins	0.1–2 mg/kg
• Dipstick	Binding to antibodies	Proteins	1.0 mg/kg
• Lateral Flow Assays	Binding to antibodies	Proteins	2.0 mg/kg
• Biosensors	Binding to antibodies	Proteins	0.5–2 mg/kg

Punti critici dei metodi immunologici

- **1) Estrazione delle proteine** : non è disponibile un solvente universale
- L'estraibilità dipende da
 - pH
 - forza ionica
 - temperatura
 - presenza di interferenti
 - effetti matrice o del processo
- L'uso di una miscela di agenti caotropici (tiourea/urea) e detergenti possono migliorare la solubilità, ma possono indurre la denaturazione della proteina, alterando così la sua rivelabilità da parte dell'anticorpo.
- La natura del surfattante può alterare il legame dell'allergene alla superficie del piatto, facendo diminuire la selettività.

Punti critici dei metodi immunologici

2) Disponibilità di sieri umani da individui ben caratterizzati clinicamente

3) Specificità degli anticorpi dagli animali

4) Standard di calibrazione

5) Disponibilità di materiali di riferimento certificati

6) Sensibilità : LOD/LOQ

Pro/Con dei metodi ELISA

• Vantaggi

- Disponibilità di molti kits commerciali
- Buona sensibilità
- Quantitativi
- Relativamente facili da maneggiare
- Relativamente veloci

Svantaggi

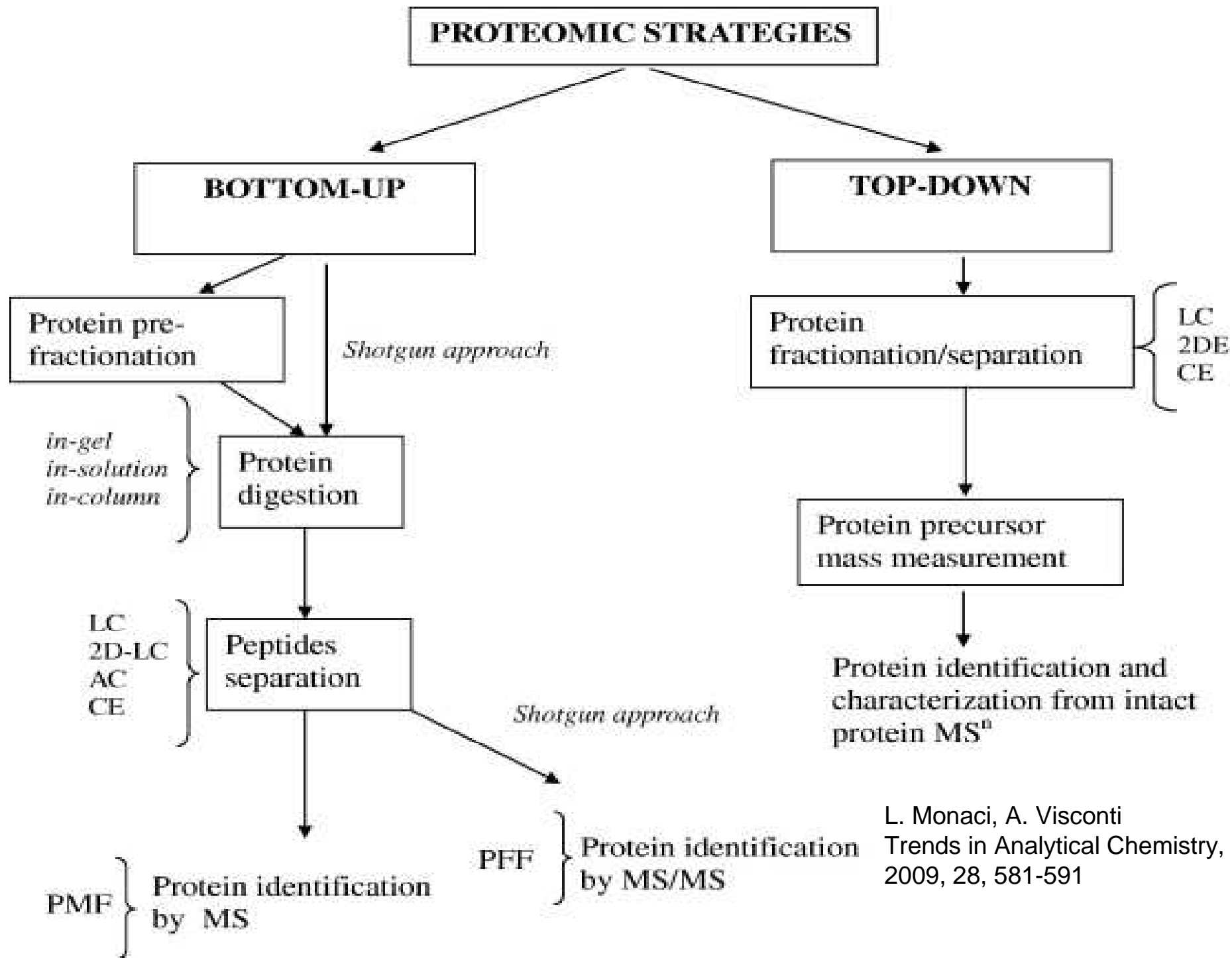
- Variabilità da kit a kit
- Dipendenza dalla matrice
- Dipendenza dal processo
- Disponibilità di materiali certificati
- Possibilità di falsi positivi/negativi

Tutti questi metodi **non prevedono la separazione delle proteine:** la reattività incrociata degli anticorpi con componenti della matrice alimentare possono portare a risultati falsi positivi.

2D-PAGE combinata con immunoblotting e Spettrometria di Massa

Vantaggi

- Separazione delle proteine: bande / spots.
- Identificazione preliminare secondo il pI e la massa.
- Separazione efficiente di proteine di massa molecolare simile.
- Incubazione con anticorpi monoclonali dotati di caratteristiche ben definite di specificità e affinità possono permettere un (pre-)screening standardizzato.
- **Svantaggi**
- La solubilizzazione con agenti caotropici e detergenti può modificare il pI e la immunorivelabilità
- Sovrapposizione delle bande / troppe bande/spots (low dynamic range)
- Range limitato di peso molecolare delle proteine (10-100 kDa)
- Necessità di una soluzione concentrata di anticorpi, normalmente sieri umani.
- Labor intensive and time consuming
- Necessità di conferma e identificazione off-line (Spettrometria di Massa)

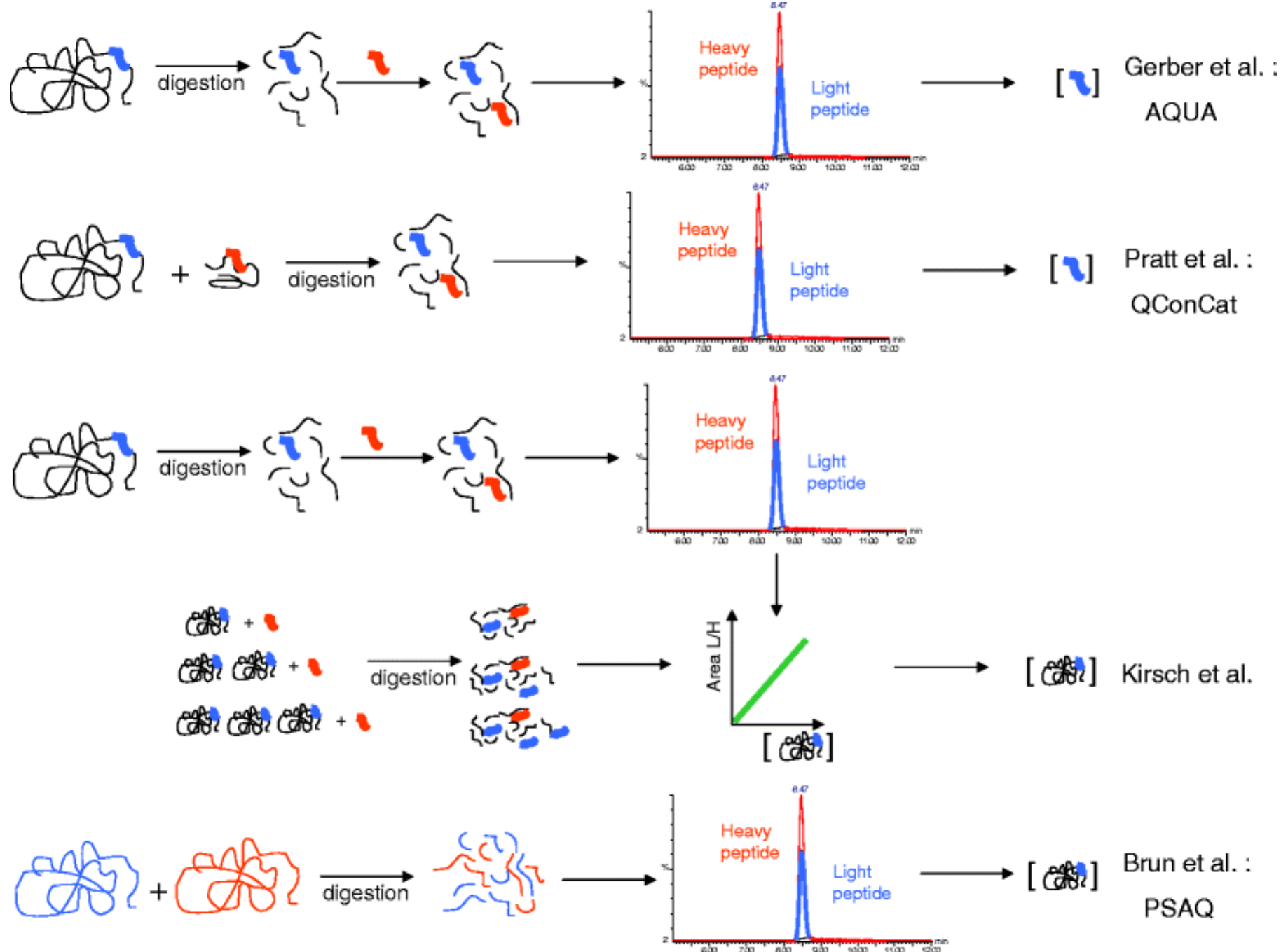


L. Monaci, A. Visconti
 Trends in Analytical Chemistry,
 2009, 28, 581-591

Metodi basati sulla Spettrometria di Massa per la determinazione di proteine allergeniche negli alimenti

Method	Protein	LOQ	REF.
• LC/ESI-MS	Milk proteins	1 mg/L	Monaci et al 2008
• LC/ESI-MS/MS	Ara h 1	10 mg/kg	Schefcheck et al 2004
• LC/ESI-MS/MS	Ara h 1	2 mg/kg	Schefcheck et al 2006
• capLC/ESI-Q/TOF	Ara h 1, 2, 3	7-40 ng/kg	Chassaigne et al 2007
• capLC/ESI-Q/TOF	Ara h 2	5 mg/kg	Careri et al 2007
• LC/ESI-IT/MS/MS	Ara h 3, 4	3 mg/kg	Careri et al 2008
• LC/ESI-MS/MS	Caseins	5 mg/kg	Weber et al 2006
• MALDI/TOF	Lysozyme	5 mg/kg	Schneider et al 2010

Quantificazione mediante peptidi isotopicamente marcati come i.s.



Conclusioni sui metodi proteomici

- **La proteomica** offre un approccio semplice alla determinazione della massa molecolare esatta dell'allergene
- Determina le modificazioni post-translazionali
- Identifica nuove isoforme di proteine allergeniche
- Può permettere determinazioni quantitative dell'allergene.

Questa metodologia richiede al momento strumenti **relativamente sofisticati e infrastrutture computazionali per analizzare efficientemente la grande e complessa quantità di dati generati**, e necessita di personale altamente qualificato.

E' costoso e per ora al di là dello scopo di analisi di routine.

Disponibile presso Laboratori di analisi specializzati.

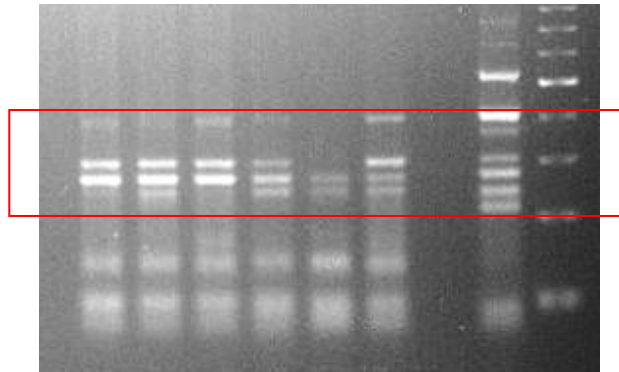
.

Metodi basati sulla determinazione del DNA dell'ingrediente

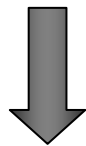
- Non necessariamente del DNA che esprime la proteina allergenica
- **Con** PCR
 - End point PCR
 - Real Time PCR
 - microarrays
- **Senza** PCR
 - SPR imaging

Si può fare una correlazione tra quantità di DNA e quantità di proteina allergenica

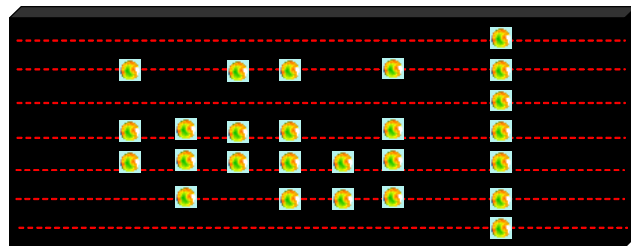
La tecnologia microarray



MULTIPLEX PCR



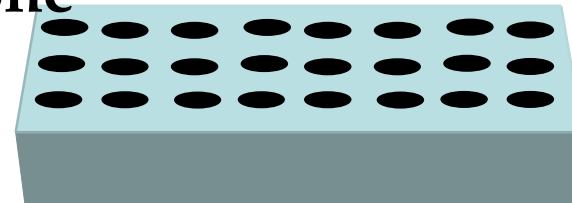
Ibridazione



MICROARRAY

**Library di sonde dedicate
agli alimenti**

Deposizione



CONCLUSIONI: tecnica PCR

VANTAGGI

Analisi specifica della maggior parte degli alimenti allergenici

LOD < 10 ppm

Analisi anche di campioni trattati al calore

In linea di principio quantitativa

Veloce nel caso della RT-PCR

Possibile analisi di più analiti simultaneamente

Adatta come metodo di conferma

Adatta per analisi di routine

SVANTAGGI

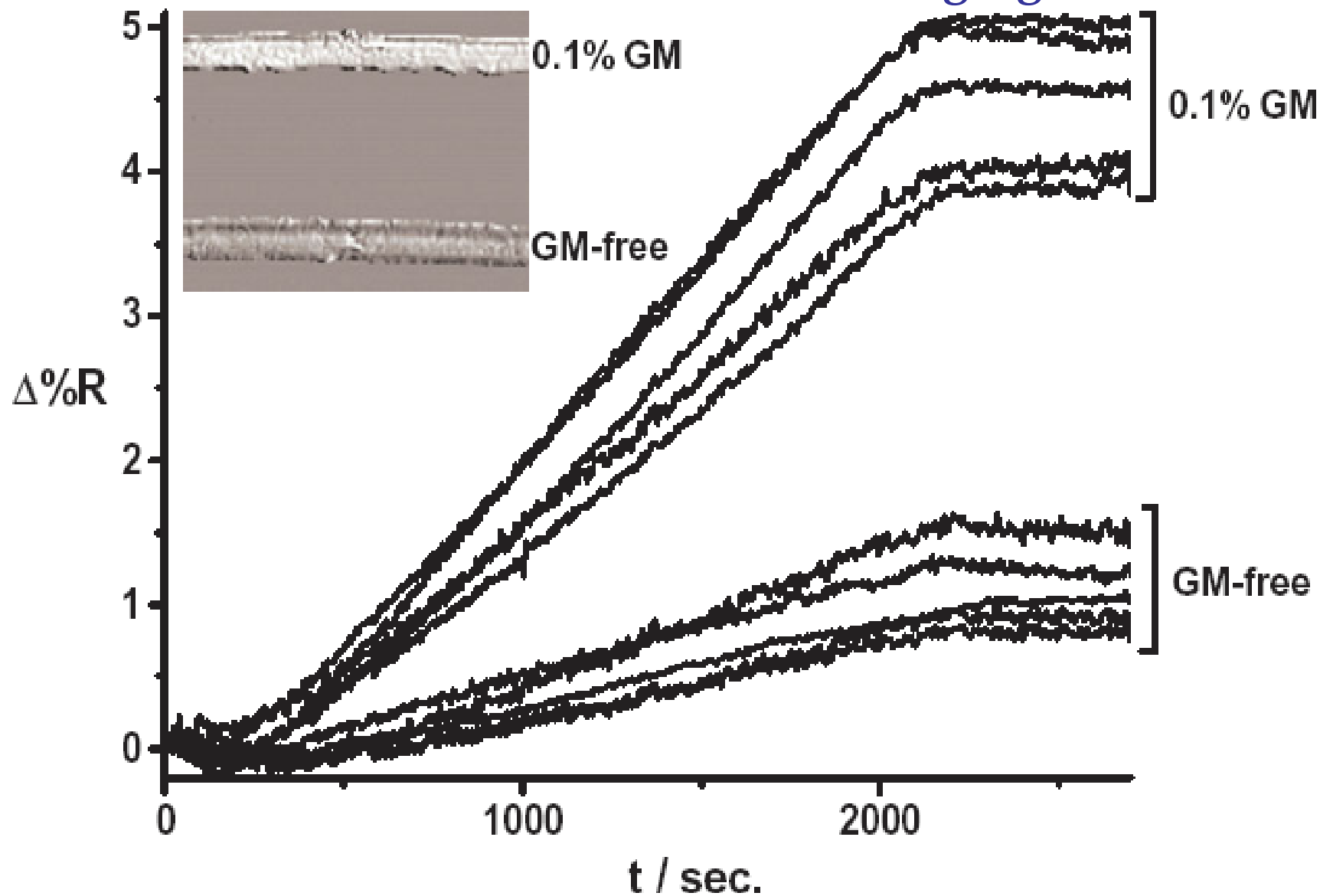
Non adatta all'analisi di prodotti acidi

Correlazione tra DNA ed espressione della proteina deve essere dimostrata

RT-PCR per analisi quantitativa con materiale di riferimento

Problemi nel caso di alimenti a basso contenuto di DNA
(es. olio)

Determinazione di DNA di soia RR senza PCR mediante SPR Imaging



Allergeni nascosti

Errori durante la lavorazione
(ingredienti sbagliati o materiali di
confezionamento non adeguati)

18%

4%

Motivi sconosciuti

18%

**Cross-contaminazioni durante
la produzione** (interessa
soprattutto il settore dei dolci e
dei prodotti a base di cioccolato)

60%

**Omissione dell'allergene in
etichetta oppure
traduzione non corretta
della lista degli ingredienti
da un'altra lingua**

Valutazione del rischio per gli allergeni alimentari

Dose Soglia : quantità di un allergene sotto la quale un individuo sensibilizzato non corre il rischio di sviluppare una allergia

Auspicabile ma difficile da valutare:

- un valore di soglia per ogni allergene/ingrediente,
- scelta dei pazienti per il clinical trial;
- severità della risposta;
- variabilità della risposta individuale;
- esposizione;
- tipo di popolazione :adulti/bambini;
- matrice alimentare;
- prodotto cotto o crudo;
-

Metodi per la valutazione del rischio

- **NOAEL «No Adverse Effect Level»**
- esprime la **dose massima** a cui una popolazione esposta all'allergene non ha sviluppato una reazione allergica, applicando fattori di incertezza
- Dose massima non tossica/ fattore di Incertezza

- **LOAEL « Lowest Observed Adverse Effect Level»**
- esprime la **dose più** bassa che ha causato una reazione avversa in una popolazione esposta, applicando fattori di incertezza
- Dose minima tossica/fattore di incertezza.

NOAEL/LOAEL

- **Vantaggi**

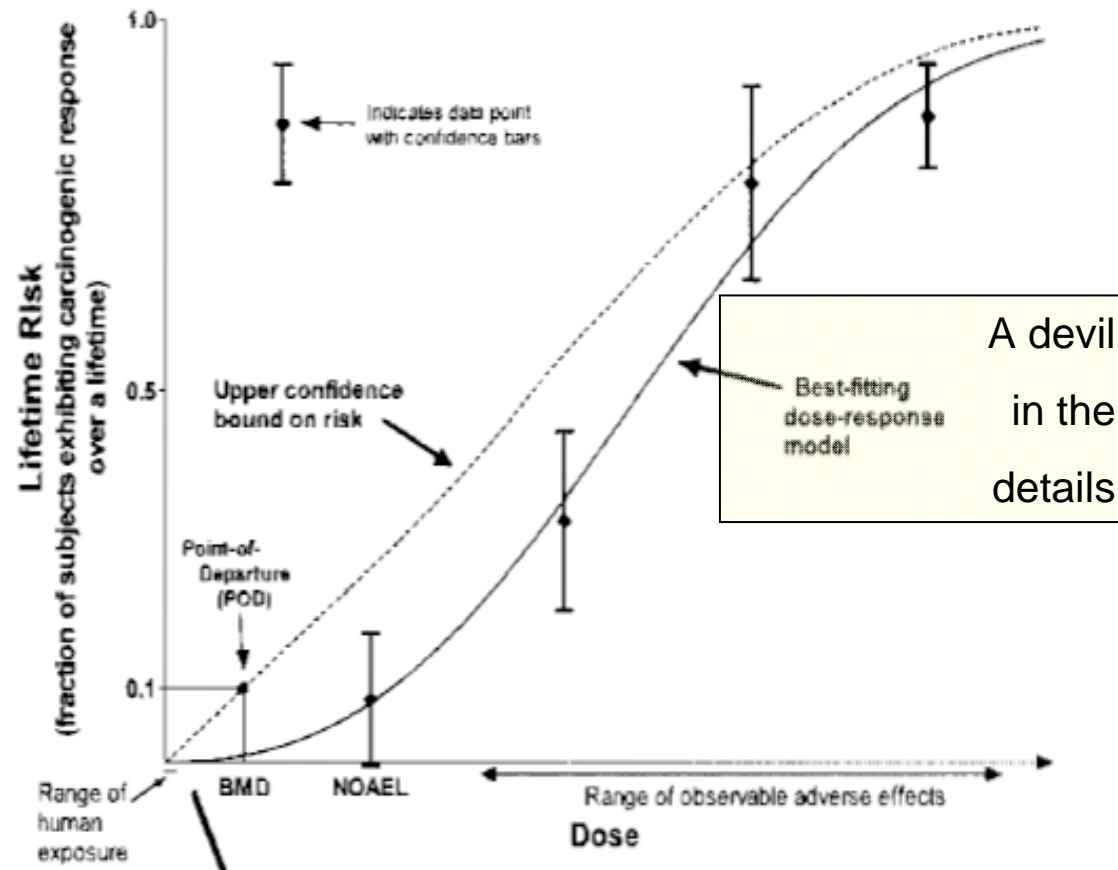
- Facili da capire
- Molto utilizzati in tossicologia per composti chimici
- Conservativi

- **Svantaggi**

- Usano un singolo dato da un singolo studio
- Esistono gap tra le dosi testate
- Qualità del dato
 - -dipende fortemente dalla qualità dello studio
 - -scarsa relazione con l'intera popolazione
- Non forniscono una valutazione quantitativa del rischio
- Troppo conservativi (a volte poco utilizzabili)

Metodi per la valutazione del rischio

- **BMD “Benchmark Dose (Dose di riferimento)”**: derivato da un modello dose-distribuzione dei dati e calcolando un margine di esposizione.
- Si utilizza l'intera curva dose-risposta e si estrapola il dato, calcolando l'intervallo di confidenza. Il limite inferiore dell'intervallo di confidenza è il BMD.
- Questa dose viene poi divisa per un fattore di incertezza
- **Più robusto di NOAEL**
- **Non dà una stima quantitativa del rischio**
- **Implica che il rischio sia tollerabile**



Procedure (Crump 1984); Figure (Rodricks 2007)

Metodi per la valutazione del rischio

- **MOED «Minimal Observed Eliciting Dose»:**
- Esprime la **dose minima** per ogni allergene capace di scatenare la reazione avversa in un individuo suscettibile, tenendo conto dell'esposizione

Valutazione del rischio: che fare?

- **Il rischio zero non esiste.**
- **Esiste un rischio accettabile?**
- **Cosa possiamo fare ora**
- **Riempire i gap nella valutazione del rischio:**
 - - migliorare le conoscenze di base sulle caratteristiche strutturali che rendono allergenica una proteina, alterazioni a seguito dei trattamenti tecnologici e cottura;
 - rendere più accessibili i metodi di analisi quantitativa;
 - valutare l'attendibilità dei **dati di NOAEL/LOAEL; BMD; MOED esistenti in letteratura** ;
 - **stimolare la ricerca sui metodi di valutazione del rischio;**
 - **stimolare la ricerca multidisciplinare.**

Cosa possiamo fare in futuro

- **Promuovere ricerche** in diversi Centri di ricerca del mondo dove si somministrano lo stesso cibo, nella stessa forma, nella stessa dose (bassa), si valutino gli stessi sintomi, adulti/bambini.
- Analisi statistica.
- Scienziati/ Valutatori del rischio/ Managers del rischio devono collaborare per realizzare la
Regulatory Science:
- **dalla ricerca di base alla valutazione del rischio al management del rischio.**
- Le agenzie internazionali (EFSA, FDA,...) devono collaborare tra di loro per arrivare ad un **consensus generale** sui vari temi della sicurezza alimentare.



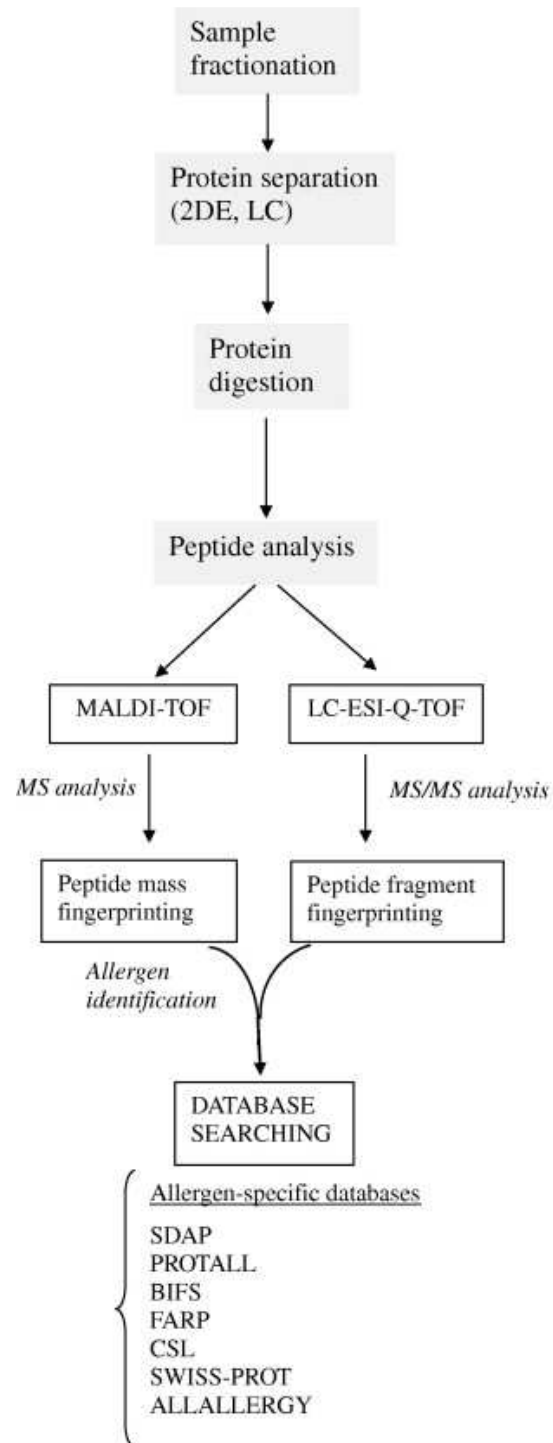
Grazie!



Grazie per l'attenzione



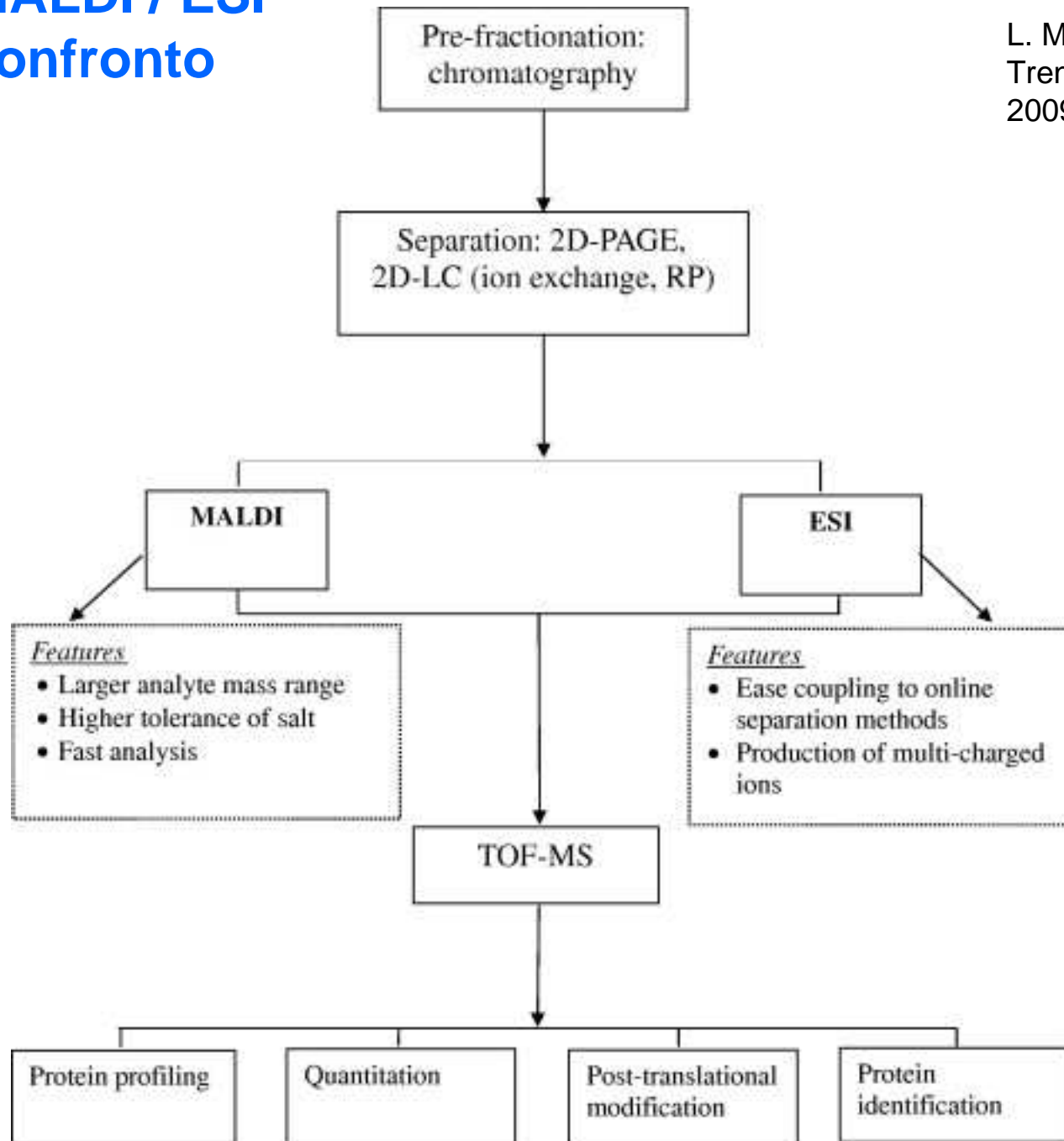
Approccio
proteomico
classico:
bottom up



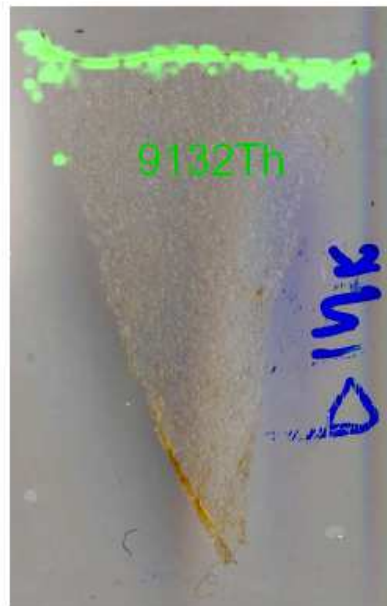
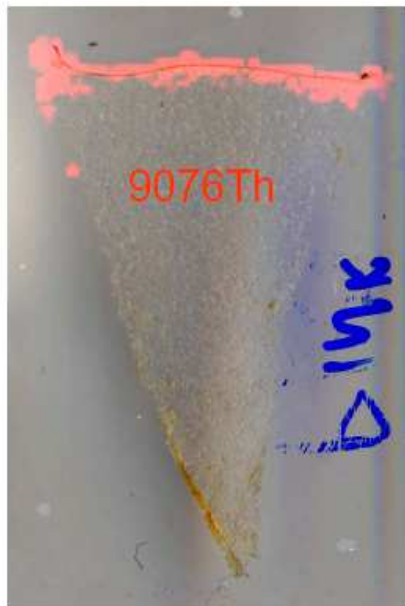
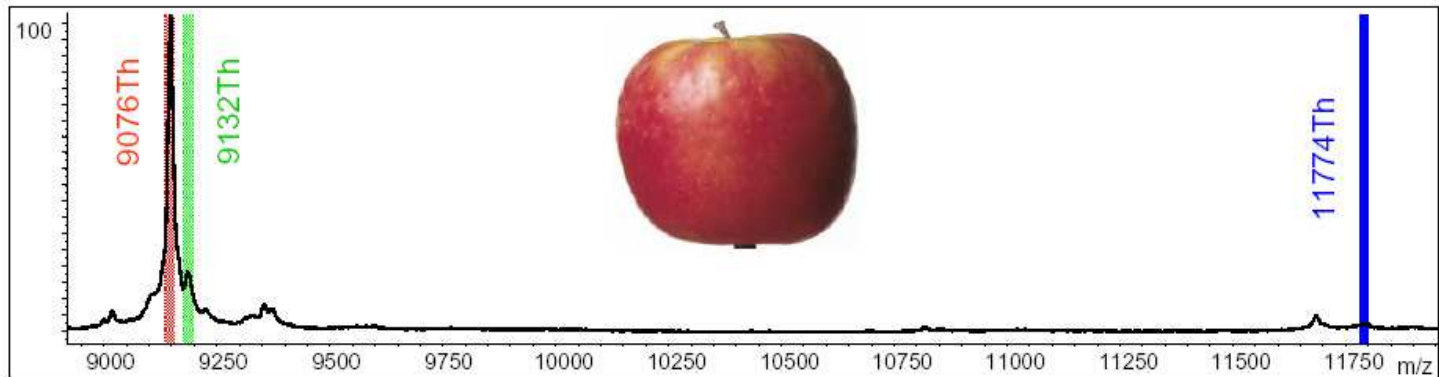
L. Monaci, A. Visconti
Trends in Analytical Chemistry,
2009, 28, 581-591

MALDI / ESI confronto

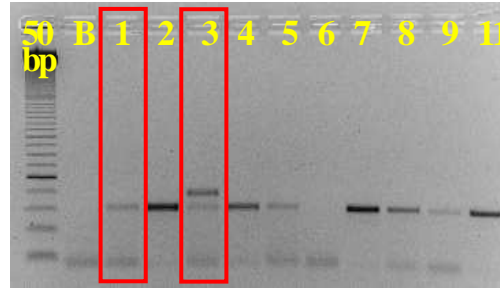
L. Monaci, A. Visconti
Trends in Analytical Chemistry,
2009, 28, 581-591



MELA pink lady

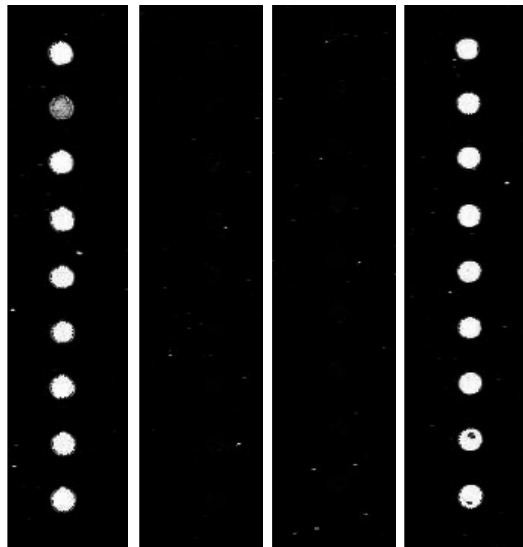


Uso di PNA microarray per la conferma post-PCR dell'identità del DNA



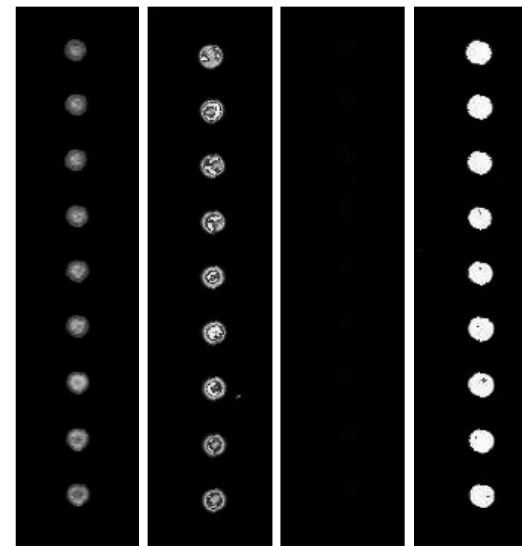
Sample 1. Breakfast cereals

Cor Ara Pru control



Sample 3. Muesli snack

Cor Ara Pru control

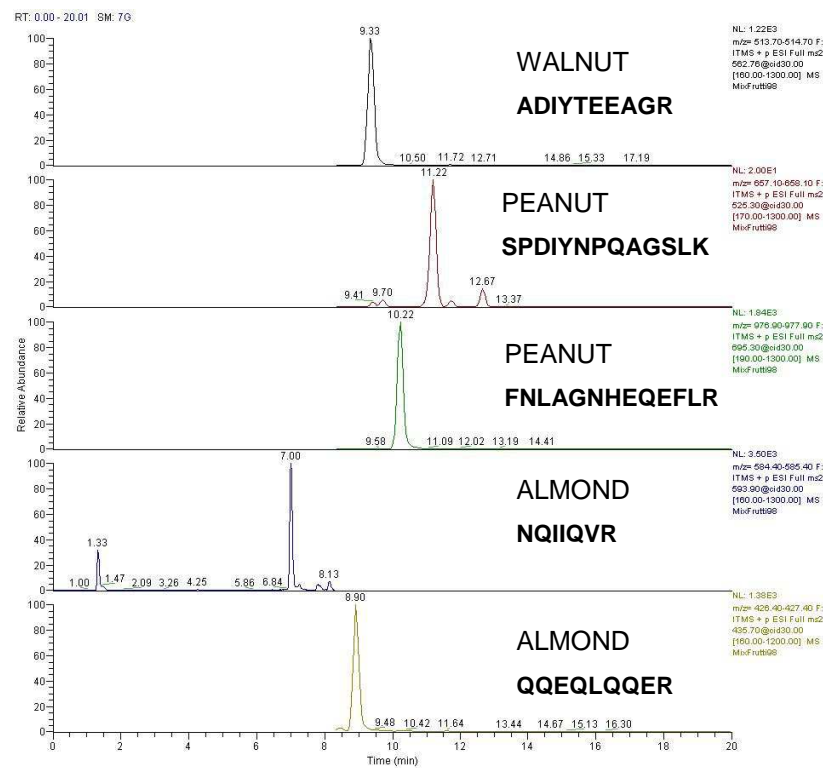
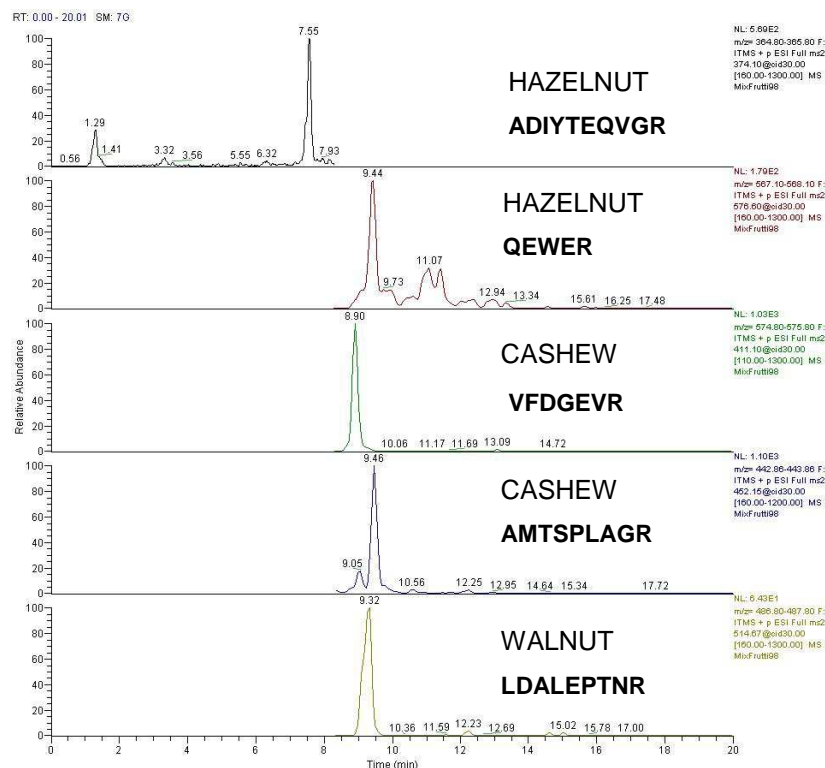


DETERMINAZIONE MULTIPLA DI

ALLERGENI

- Pru 1, Almond
- Ana o 2, Cashew
- Cor a 9, Hazelnut
- Ara h 3/4, Peanut
- Jug r 4, Walnut

Analisi HPLC-MS/MS di peptidi marker



Particle-packed column versus silica-based monolithic column for liquid chromatographic-electrospray-linear ion trap-tandem mass spectrometry multiallergen trace analysis in foods

C. Bignardi, L. Elviri, A. Penna, M. Careri, A. Mangia, *J Chromatogr A* 48 (2010) 7579

10 PANELS

HAW	Salute e benessere degli animali
ANS	Additivi alimentari e origine di nutrienti aggiunti agli alimenti
BIOHAZ	Pericoli biologici
CEF	Materiali a contatto con gli alimenti, enzimi, aromatizzanti e coadiuvanti tecnologici
CONTAM	Contaminanti nella catena alimentare
FEEDAP	Additivi, prodotti e sostanze per mangimi
GMO	Organismi geneticamente modificati
NDA	Nutrizione, prodotti dietetici e allergie alimentari
PLH	Salute delle piante
PPR	Prodotti per la salute delle piante
SC	Comitato scientifico
AFC	Ex panel sugli additivi alimentari, aromatizzanti, coadiuvanti tecnologici e materiali a contatto con gli alimenti

- **EFSA esprime **Opinioni Scientifiche (Risk Assessment)****
- **Commissione Europea**
- **Parlamento Europeo**
- **Consiglio Europeo**
deliberano e formulano le normative
(Risk Management)

Obiettivi

- Assicurare che i consumatori che soffrono di allergie o di intolleranze a certi alimenti o che vogliono evitare il consumo di certi ingredienti per qualsiasi altro motivo siano adeguatamente informati.
- Evitare che l'industria alimentare abbia l'obbligo di dichiarare nell'etichetta certi ingredienti o sostanze che, anche se derivanti da prodotti allergenici, non comportano un rischio ragionevole per le persone allergiche.

Metodi separativi: 1D e 2D- SDS PAGE

(a)

**Separation
in first
dimension
(by charge)**

Protein
mixture

pH 4.0

Isoelectric
focusing (IEF)

pH 10.0

Apply first gel
to top of second

pH 4.0

pH 10.0

**Separation
in second
dimension
(by size)**

SDS
electrophoresis

