

---

SCUOLA DI SCIENZE  
Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in  
**Chimica Industriale**  
Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

*Applicazione di tecniche untarget molecolari e  
chimiche per la ricerca di allergeni vegetali in alimenti*

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

**Beatriz Dos Anjos Timas**

**RELATORE**

**Dott.ssa Alessandra Stefan**

**CORRELATORE**

**Dott.ssa Sonia Scaramagli**

---

**Anno Accademico 2019-2020**

---



# Indice

Abstract.....	7
1. Introduzione bibliografica .....	8
1.1 Allergia - storia e nomenclatura .....	8
1.2 Definizione di allergia alimentare .....	9
1.3 Classificazione reazioni di ipersensibilità alimentari .....	11
1.4 Prevalenza.....	11
2. Meccanismo delle reazioni IgE immune-mediate.....	13
2.1 Tolleranza orale.....	14
2.2 Sensibilizzazione.....	15
2.3 Elicitazione della reazione allergica.....	16
3. Intolleranze alimentari .....	17
3.1 L'esempio della Celiachia.....	17
4. Allergeni Vegetali.....	18
4.1 Classificazione delle proteine allergeniche vegetali in famiglie e superfamiglie .....	19
Superfamiglia delle Prolamine.....	20
Superfamiglie delle Cupine.....	23
Superfamiglia Bet v 1 o PR-10.....	23
Famiglia delle Profiline .....	23
5. Allergenicità delle proteine vegetali .....	24
5.1 Effetto dei processi di lavorazione nell'allergenicità.....	24
5.2 Reazioni crociate tra gli allergeni .....	26
6. Alcuni alimenti allergenici .....	28
6.1 Frutta a guscio.....	28
Composizione chimica.....	28
Consumo e benefici per la salute.....	29
Allergia.....	29
6.2 Arachide.....	30
6.3 Soia .....	30
6.4 Sesamo.....	31
6.5 Senape e colza.....	31
7. Sicurezza alimentare, Etichettatura e Legislazione degli allergeni alimentari .....	33
7.1 Etichetta.....	33
7.2 Legislazione .....	33

7.3	Allergeni nascosti .....	35
7.4	Etichettatura precauzionale PAL .....	36
	Richiamo di un prodotto .....	37
8.	Metodi immunoanalitici per la determinazione di allergeni in matrici alimentari.....	38
9.	Metodi di biologia molecolare usati nel rivelamento degli allergeni alimentari.....	40
9.1	DNA come marcatore molecolare.....	40
	Effetto della Matrice Alimentare .....	41
	Struttura del DNA.....	41
9.2	PCR: reazioni a catena della polimerasi.....	42
	PCR end-point.....	42
	Real-time PCR .....	44
9.3	Quantificazione del DNA.....	46
10.	Identificazione di specie .....	48
10.1	DNA Barcoding .....	48
10.2	Sequenziamento del DNA .....	49
	Metodo Sanger .....	49
	Next Generation Sequencing (NGS).....	50
	Piattaforma NGS Ion Torrent.....	50
11.	Analisi fingerprinting dei composti volatili negli alimenti .....	52
11.1	VOC's nella frutta a guscio .....	52
11.2	VOC's nella frutta a guscio dopo la tostatura .....	54
11.3	Nozione di Cromatografia.....	54
11.4	Gas-cromatografia e analisi dei composti volatili .....	54
11.5	Fast-GC: HERACLES II .....	55
	Analisi dei dati.....	56
12.	Scopo della Tesi.....	59
13.	Materiali e Metodi .....	60
14.1	DNA Barcoding .....	60
	Campioni di alimenti allergenici per le analisi .....	60
	Preparazione delle matrici alimentari (spiking).....	61
	Estrazione e Purificazione del DNA genomico totale.....	62
	Quantificazione del DNA .....	64
14.2	Sequenziamento NGS con il sistema Ion Torrent.....	65
	Preparazione della <i>library</i> .....	67
	Analisi dei dati.....	71
14.3	Real-time PCR.....	71

Campioni.....	72
Estrazione e Quantificazione del DNA genomico totale .....	72
<i>Primers</i> e sonde .....	72
Reazione di amplificazione tramite <i>Real-time</i> PCR su DNA estratto dalle matrici .....	74
14.4 HERACLES II .....	76
14. Risultati e Discussione .....	78
15.1 DNA <i>barcoding</i> e sequenziamento in Ion Torrent.....	78
Interpretazione dei risultati.....	79
Prove di sensibilità del metodo nel rivelamento di specie allergiche vegetali (arachide e noce) presenti nella farina tipo “00” .....	83
15.2 Real-time PCR per la rilevazione di allergeni vegetali .....	85
Analisi della specificità e della sensibilità.....	85
15.3 Elaborazione chemiometrica dei dati.....	89
15. Conclusioni.....	93
Bibliografia .....	95



# SEDE DI SVOLGIMENTO DEL TIROCINIO

In Ente esterno

Questo lavoro di Tesi è stato svolto presso i Laboratori di Biologia Molecolare e di Chimica della

COOP ITALIA Società Cooperativa COOP

Via del Lavoro 6/8, Casalecchio di Reno (BO)

# Ringraziamenti

Questa Tesi è dedicata alla mia famiglia che mi è sempre stata vicino durante tutto il mio percorso accademico.

Grazie anche a Matteo e alla sua famiglia che mi hanno accolto con molto carino mi hanno sempre appoggiato e spinto per andare avanti.

Per ultimo, ma non meno speciale, voglio ringraziare il mio tutore accademico, la responsabile del laboratorio di biologia molecolare di COOP Italia, per la pronta disponibilità e per tutto quello che mi hanno insegnato durante i mesi di svolgimento del tirocinio/stesura di questo lavoro.

A tutti grazie di cuore.

## Abstract

I frutti secchi ed i semi commestibili hanno comprovati benefici per la salute, essendo il loro consumo relazionato con la riduzione del rischio di malattie croniche. Tuttavia, questi alimenti hanno un elevato potenziale allergico per una piccola parte della popolazione mondiale, che non può fare altro che evitarli nella loro dieta. A causa del fatto che le allergie e le intolleranze alimentari sono in aumento, diventa importante conoscere tutti i componenti presenti in un alimento, anche se in tracce, poiché anche una piccola quantità di una proteina allergenica può causare i sintomi di allergia. Il Regolamento (UE) n°1169/2011 ha normalizzato le leggi sull'etichettatura obbligatoria delle sostanze che causano allergie ed intolleranze alimentari, ma non ha stabilito l'obbligo di elencare queste sostanze quando esse sono presenti in maniera "nascosta", ossia quando si ha il sospetto della loro presenza o quando presenti non deliberatamente negli alimenti. Di conseguenza, vi è l'urgente necessità di metodi specifici e affidabili in grado di rilevare allergeni proteici negli alimenti. I metodi analitici per il rivelamento degli allergeni nascosti sono molto importanti in quanto permettono di garantire la sicurezza alimentare e la conformità delle etichette, migliorando così la vita dei consumatori allergici. Sebbene le tecniche immunologiche siano più specifiche per l'identificazione delle proteine allergeniche, le tecniche basate sul DNA sono più adatte per matrici alimentari molto complesse o nel caso di alimenti che hanno subito numerosi processi di trasformazione, mostrandosi come metodi alternativi affidabili.

L'obiettivo primario di questo lavoro di tesi è stato quello di sviluppare una metodica per il rilevamento di specie allergeniche vegetali (frutta a guscio e semi commestibili) in matrici alimentari usando la tecnica del DNA *Barcoding*, ed in un secondo momento si è usato la tecnica della *Real-time* PCR. I vantaggi di queste tecniche sono, oltre alla necessità di quantità minime di campione, la possibilità di identificare varie specie allergeniche in simultaneo, anche dopo avere subito bruschi processi di lavorazione. Si è inoltre fatta l'analisi *fingerprinting* dei composti volatili su matrici alimentari costruite in laboratorio attraverso il gascromatografo HERACLES II (Alpha M.O.S).

Le metodiche sviluppate possono fungere come metodi di screening veloci ed affidabili nella riduzione di possibili contaminazioni dei prodotti alimentari, rilevando la presenza o confermando l'assenza degli allergeni vegetali.

Parole chiave: allergia alimentare; allergeni nascosti; rilevamento di allergeni vegetali; DNA *Barcoding*; *Real-time* PCR; Heracles II

# 1. Introduzione bibliografica

## 1.1 Allergia - storia e nomenclatura

L'allergia è una parola greca che deriva da ἄλλος (*allos*) che vuol dire 'altro o differente' e ἔργον (*ergia*) che vuol dire 'energia od azione'. La parola allergia fu introdotta in 1906 dal pediatra Clemens von Pirquet (1824-1929, Vienna-Austria), per definire il cambiamento nella reattività del sistema immunitario dopo l'esposizione ad una sostanza apparentemente innocua [1].

Louis Pasteur e i suoi collaboratori, tra la fine del XIX e l'inizio del XX secolo, avevano descritto un sistema nuovo al quale hanno attribuito la funzione di difesa dell'organismo dagli attacchi da parte dei microrganismi. A questo sistema venne dato il nome di "sistema immunitario".

Secondo Pirquet, cambiamenti del sistema immunitario potevano fornire una protezione totale, o parziale, al soggetto entrato in contatto con una sostanza estranea impedendo la comparsa sintomi (in accordo con Pasteur), oppure la sostanza innocua poteva essere dannosa e causare sintomi e segni di malattia nel soggetto colpito [1]. Il concetto di allergia di Pirquet non venne accettato da parte dei colleghi perché nessuno voleva ammettere che lo stesso sistema immunitario potesse danneggiare l'organismo.

Negli anni successivi, il concetto di allergia è stato oggetto di confusione e, in molti casi, è stato definito erroneamente. Ad esempio, il termine allergia viene usato per definire tutti i tipi di reazioni imprevedibili riscontrati sulla pelle e sulle superficie delle mucose, causate da alimenti o additivi contenuti negli alimenti. Inoltre lo stesso termine è usato anche per definire effetti secondari comparsi in seguito all'assunzione di farmaci, disordini comportamentali, eccetera [2].

Nel libro *Clinical Aspects of Immunology* (1963), Philip Gell e Robin Coombs hanno restituito l'etimo all'idea di Pirquet, usando il termine reazioni allergiche per definire le reazioni di ipersensibilità capaci di causare danni ai tessuti. Inoltre, è stata proposta la classificazione delle reazioni di ipersensibilità in quattro tipi, a seconda del meccanismo di difesa che viene attivato dal sistema immunitario per combattere gli organismi estranei, ed è ancora oggi accettata per la maggiore parte degli immunologici [1]. I quattro tipi di reazioni di ipersensibilità definiti dai due immunologici sono:

*Tipo I – reazioni immediate che implicano la produzione di anticorpi di tipo IgE<sup>1</sup>.*

*Tipo II – reazioni di tipo citotossiche, mediate dagli anticorpi IgG ed IgM.*

*Tipo III – reazioni che coinvolgono la formazione, nel sangue, di un complesso anticorpo-antigene (immunocomplesso), anch'esse mediate dagli anticorpi IgG ed IgM.*

*Tipo IV – reazioni di tipo cellula-mediata (non ci sono anticorpi implicati) e, al contrario delle reazioni di Tipo I, non sono immediate.*

Questa classificazione è stata d'aiuto per la conoscenza iniziale dei meccanismi immunologici; oggi, tuttavia, studi avanzati hanno dimostrato che, oltre agli anticorpi e alle cellule immunocompetenti (linfociti), partecipano nella risposta immunitaria altre cellule, come le cellule dendritiche, le cellule T e diverse altre cellule effettrici [2].

L'Accademia Europea di Allergia e Immunologia Clinica (EAACI, in inglese), ha rivisto nel 2001 la nomenclatura per le reazioni allergiche ad esse correlate, al fine di stabilire un linguaggio comune. L'Accademia ha stabilito che l'allergia è una “reazione di ipersensibilità mediata da meccanismi immunologici”. Sempre secondo la *task force*, una reazione di ipersensibilità induce sintomi e segni oggettivamente riproducibili, frutto dall'esposizione a stimoli che non provocano nessun effetto sui soggetti “normali” [2].

Johannes Ring [3] afferma che l'allergia di per sé non è una malattia, ma è un meccanismo che si sviluppa fino ad arrivare ad una malattia.

## 1.2 Definizione di allergia alimentare

L'allergia alimentare è una reazione sproporzionata del sistema immunitario che si verifica in seguito all'ingestione, contatto o inalazione di una sostanza considerata innocua per la maggior parte della popolazione, in cui si sviluppano dei meccanismi immunologici che comportano gravi danni per la salute [4]. La sostanza innocua è una componente del cibo oppure un suo additivo, ed è chiamata “allergene alimentare”.

---

<sup>1</sup> Il meccanismo che descrive come si sviluppa una reazione di Tipo I sarà oggetto di approfondimenti più avanti nel testo.

L'Istituto Nazionale di Allergie e Malattie Infettive degli Stati Uniti (NIAID, in inglese) ha definito l'allergia alimentare come un effetto negativo sulla salute derivante da una specifica risposta immunitaria che si verifica in modo riproducibile all'esposizione ad un determinato alimento [5]. Nella maggioranza dei casi, gli anticorpi implicati nello sviluppo di una reazione allergica alimentare appartengono all'isotopo dell'immunoglobulina E, IgE. Questo succede, in particolare, nelle allergie all'arachide, al latte, ai frutti secchi, alle uova, al pesce e ai frutti di mare, alla soia o ai cereali [6]. Sono chiamati allergeni alimentari di Classe I gli allergeni che provocano la sensibilizzazione del sistema immunitario per via orale, e allergeni di Classe II quelli che invece sensibilizzano per via aerea. Allergeni di Classe I sono quelli che causano, ad esempio l'allergia all'arachide, al latte, alle uova. Allergeni di Classe II sono responsabili, per esempio, dell'allergia al polline di betulla [6]. Nonostante siano conosciuti come causa di allergia alimentare più di 170 alimenti, la *Codex Commitee on Food Labelling* (CCFL) ha istituito una lista di solo 8 alimenti che contengono i principali allergeni, e che rappresentano oltre il 90% di tutte le reazioni allergiche alimentari IgE immune-mediate [7]. Gli 8 alimenti ("the big 8") che sono considerati essere i maggior allergeni sono: arachide, cereali, crostacei, frutta a guscio, latte, pesce, soia e uova.

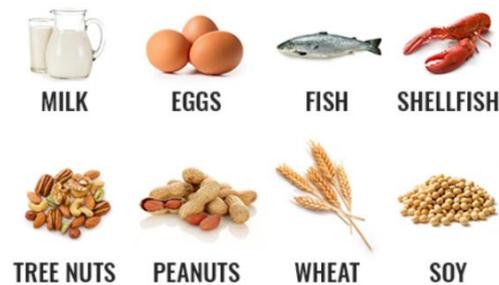


Figura 1- Gli otto maggior alimenti allergenici "The Big 8" [8].

I sintomi clinici associati all'ingestione di allergeni da parte di persone sensibili includono orticaria, prurito, edema, broncocostrizione, rinite, vomito, diarrea, crampi e, in casi gravi, sintomi cardiovascolari che possono portare a shock anafilattico, che può avere conseguenze fatali [9].

Le reazioni allergiche alimentari IgE immune-mediate sono molto rapide, con tempi di manifestazioni dei sintomi tra 30 minuti e 2 ore [10].

### 1.3 Classificazione reazioni di ipersensibilità alimentari

Già nel 1995, l'EAACI ha proposto una classificazione basata sui meccanismi patogenetici delle reazioni avverse al cibo che permette di distinguere le reazioni in tossiche e non tossiche. Un'altra classificazione ancora in uso è quella fatta da Gell e Coombs, che raggruppa le allergie alimentari nella classe delle reazioni di ipersensibilità di Tipo I ovvero reazioni IgE immune-mediate. [6].

Le reazioni tossiche al cibo non dipendono dall'individuo, ma dipendono dalla dose di sostanza tossica ingerita. Le reazioni non tossiche, invece, dipendono dalla predisposizione degli individui (atopia) e includono le risposte IgE immune-mediate, le non IgE immune-mediate o una combinazione dei due (Figura 1) [2].

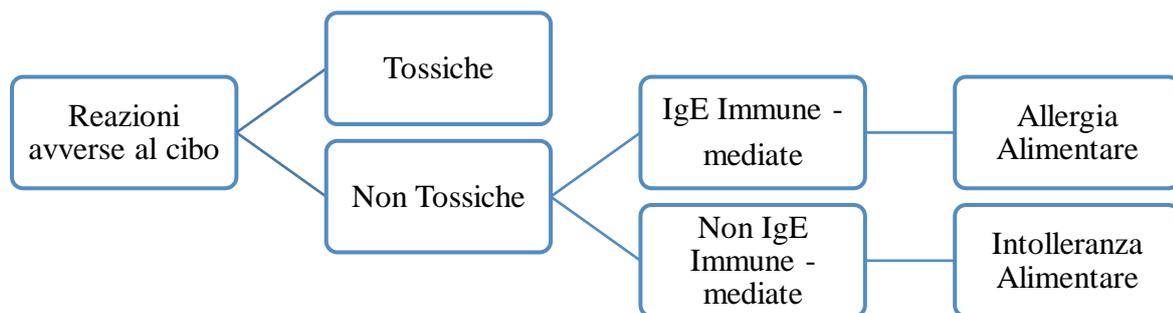


Figura 2- Classificazione delle reazioni avverse al cibo secondo l'EAACI. Adattato da [6].

### 1.4 Prevalenza

Per prevalenza s'intende la percentuale di una popolazione che ha riscontrato una reazione allergica. Dati sulla prevalenza delle allergie indicano che le reazioni allergiche agli alimenti sono in aumento e riguardano maggiormente le popolazioni dei paesi occidentalizzati [11].

In Europa, sono più di 150 milioni i cittadini che soffrono di malattie allergiche [12]. Tra le malattie croniche, quelle allergiche respiratorie come la rinite allergica e l'asma, colpiscono 100 milioni e 70 milioni di pazienti, rispettivamente. La previsione è che nel 2025 più di metà della popolazione europea sarà affetta da una qualche forma di allergia [13].

Numerosi sono gli studi portati avanti dall'EAACI per capire la situazione europea nei confronti del problema delle allergie alimentari. Secondo quanto è stato pubblicato nelle “Linee Guida EAACI sulle Allergie Alimentari e l'Anafilassi - 2013”, circa 17 milioni di adulti e un bambino su quattro in età scolare presentano un qualche tipo di reazione allergica, con ben 3,5 milioni di giovani con età inferiore a 25 anni. In Italia si stima che il 3,5% della popolazione soffra di una reazione allergica al cibo. I casi di anafilassi stanno aumentando principalmente in età pediatrica [11].

Tra il 2015 e il 2016 è stata svolta un'indagine per analizzare la diffusione e la gravità delle allergie nella popolazione americana, e il risultato ha dimostrato che un adulto su dieci possiede un'allergia alimentare [14].

## 2. Meccanismo delle reazioni IgE immune-mediate

Le IgE (Immunoglobuline E) sono una classe di anticorpi scoperti negli anni sessanta grazie ai lavori indipendenti di Kimishige e Teruko Ishizaka negli Stati Uniti, e Johansson e Bennich in Svezia. La loro scoperta ha aperto la strada alla comprensione dei meccanismi immunologici e farmacologici coinvolti nelle reazioni allergiche alimentari [2].

Gli anticorpi IgE sono prodotti dal corpo umano per combattere le infezioni causate da parassiti, come i vermi [11].

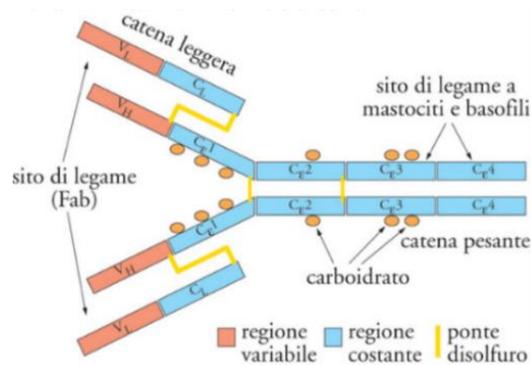


Figura 3- Rappresentazione schematica della struttura di un anticorpo IgE con le parti costituenti. L'anticorpo è costituito da due catene pesanti e due catene leggere (Fab= frammenti con sito di legame per l'antigene, (Fab = Fragment, Antigen Binding; Fc= frammento cristallizzabile (Fc = Fragment, crystallizable) e la struttura è a forma di Y. La struttura presenta in punta il sito del legante dell'antigene (regione Fab) che è una zona analoga ad una serratura chiamata paratopo, dove l'anticorpo riconosce l'antigene e si lega. I frammenti Fc sono invece quelli che interagiscono con i recettori FcεR I dei mastociti e basofili. Adattato da: Enciclopedia Treccani.

Il legame tra l'anticorpo IgE e l'allergene si stabilisce tramite varie tipi di interazioni non covalenti, quali legami a idrogeno, interazioni idrofobiche, forze di van de Waals e forze elettrostatiche. La forza di questo legame viene chiamata affinità dell'anticorpo ( $K_a$  - costante di dissociazione) e ha valori tra  $10^6$  a  $10^{11}$  L/mol [15].

Il sistema immunitario di alcuni individui fornisce erroneamente una risposta immunitaria, con conseguente sovrapproduzione di IgE e risposte irregolari da parte delle reti di cellule coinvolte nella reazione ad un alimento innocuo, provocando allergie alimentari. I motivi di questa risposta indesiderabile al momento attuale non sono chiari [11].

Si possono individuare tre fasi nella risposta del sistema immunitario nei confronti di un allergene. Tali fasi sono descritte nella figura seguente:

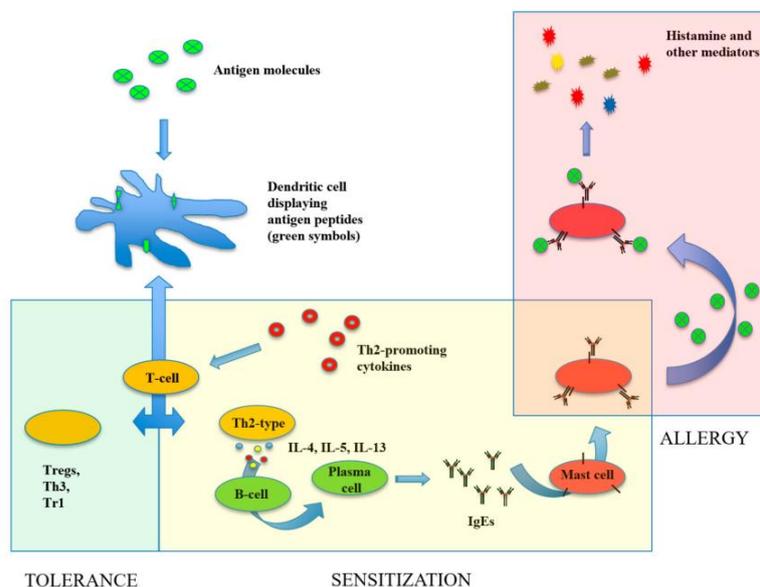


Figura 4- Processo di sviluppo di tolleranza, sensibilizzazione e reazione allergica mediate dagli anticorpi IgE e varie cellule del sistema immunitario. Fonte: [16].

## 2.1 Tolleranza orale

In seguito all'ingestione del cibo, le proteine alimentari vengono digerite dall'azione del succo gastrico e da enzimi chiamati proteasi (endopeptidasi e esopeptidasi), presenti nel lume del tratto gastrointestinale. Le proteine vengono così idrolizzate e ridotte a peptidi di peso molecolare inferiore. Una volta completato il processo di digestione, le proteine che sono rimaste intatte, i peptidi e gli aminoacidi liberi vengono assorbiti, ossia trasferiti dalla mucosa intestinale al sangue, dopodiché, vengono utilizzati dalle cellule per il loro fabbisogno di energia e nutrienti [17], [18], [19]. Tuttavia, alcuni allergeni alimentari possono scatenare una reazione allergica come risposta del sistema immunitario, in seguito alla segnalazione della loro presenza nel circolo sanguigno nel caso in cui la tolleranza orale non venga stabilita [19].

Per tolleranza orale (immunitaria) si intende una serie di meccanismi immunologici che consentono all'organismo di "tollerare" una proteina allergenica presente nel cibo. Questo processo prevede il corretto riconoscimento dell'allergene da parte dei linfociti T e B (chiamate cellule regolatrici) come "sicuro", e l'inattivazione dei meccanismi di autodifesa dell'organismo contro l'allergene, che

comporterebbe gravi danni all'organismo stesso. In particolare, le cellule dendritiche catturano le proteine allergeniche nel lume gastrointestinale, le modificano la loro struttura idrolizzandoli a peptidi piccoli e li dispongono sulla loro superficie. A questo punto, le cellule dendritiche si spostano verso il linfonodo mesenterico dove presentano gli allergeni ai linfociti T: le cellule dendritiche sono dette cellule presentatrici dell'allergene proprio per questa ragione [18].

I linfociti T (anche detti cellule T) non sono in grado di riconoscere direttamente l'allergene. Il riconoscimento avviene grazie ai ricettori presenti sulle membrane delle cellule dendritiche e grazie a ricettori (TCR) disposti sulle membrane delle cellule T. I ricettori presenti sulle membrane delle cellule dendritiche sono proteine appartenenti al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC, in inglese). I ricettori TCR disposti sulla superficie della cellula T riconoscono il complesso proteine MHC-allergene, dopodiché, la cellula attiva ulteriori cellule T-soppressori, quali Treg, Th3 e Tr1, che inducono la tolleranza immunitaria.

## 2.2 Sensibilizzazione

Può succedere che la tolleranza immunitaria non funzioni, di conseguenza l'allergene viene etichettato dalla cellula T come "non-sicuro". A questo punto, la cellula T regolatrice si differenzia in cellule *Th2 helper*. Le cellule *Th2 helper* producono delle citochine (mediatori polipeptidici), come le interleuchine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 [16], [20]. Sembra che queste citochine, in particolare le IL-4 e IL-13, orchestrino la difesa del sistema immunitario contro l'allergene inducendo la produzione degli anticorpi IgE da parte delle cellule B (dette anche linfociti B). Le cellule B si differenziano in plasmacellule specializzate nella produzione di anticorpi IgE allergene-specifici e cellule di memoria [21].

Gli anticorpi IgE prodotti dalle plasmacellule si legano inizialmente alla superficie dei mastociti (reazione immediata) e, successivamente, legano i basofili (reazione ritardata) grazie all'interazioni degli anticorpi con recettori specifici presenti sulla membrana dei mastociti, ai quali si legano con elevata affinità [20]. I mastociti ed i basofili sono cellule del sistema immunitario innato impegnate nella protezione dell'organismo, e presentano nel loro citoplasma strutture granulari in cui si trovano potenti mediatori infiammatori. Si dice che il sistema immunitario è stato sensibilizzato, tuttavia l'individuo in questa fase non presenta nessun sintomo [16], [6].

## 2.3 Elicitazione della reazione allergica

La reazione allergica vera e propria avviene in seguito alla riesposizione dell'allergene, riconosciuto dagli anticorpi IgE che sono stati prodotti precedentemente e che si trovano legati sulla membrana dei mastociti. Questo riconoscimento attiva i mastociti e provoca la loro degranulazione, con conseguente liberazione dei mediatori infiammatori nella corrente sanguinea. Questi mediatori infiammatori, quali l'istamina, le proteasi e l'eparina, provocano la reazione allergica vera e propria, con sintomi più o meno gravi per gli individui atopici [19]. L'istamina provoca la dilatazione dei vasi sanguigni e aumenta la permeabilità dei capillari [17]. I sintomi possono manifestarsi non solo nell'intestino, ma altri organi possono essere affetti, come il tratto respiratorio, la pelle ed i sistemi circolatori [6].

## 3. Intolleranze alimentari

Al contrario dell'allergia alimentare, dove sono presenti le reazioni IgE immune-mediate, l'intolleranza alimentare è una classe di reazione di ipersensibilità non IgE immune-mediata. Le reazioni non IgE immune-mediate sono reazioni ritardate, potendosi manifestarsi dopo ore o giorni dopo che l'alimento sia stato ingerito, e si possono manifestare con sintomi lievi o anche cronici, affettando principalmente il tratto gastrointestinale.

I meccanismi d'azione non immune-mediate possono essere [22], [23]:

- enzimatici, ossia dipendenti di carenze di enzimi (come per esempio: lattasi, sucrasi-isomaltasi e trealasi) indispensabile per l'assorbimento intestinale;
- farmacologici, come conseguenza di alcune sostanze presenti negli alimenti, assunte in dosi elevate (intolleranza all'istamina o al malto della birra );
- indefinite (intolleranza agli additivi).

### 3.1 L'esempio della Celiachia

La Celiachia uno stato di aumentata iperresponsività immunologica al glutine in individui atopici [24]. È una delle patologie permanenti più frequenti, in quanto colpisce circa l'1% della popolazione mondiale con circa 206.561 pazienti effettivamente diagnosticati. La malattia è più frequente nelle donne, con un rapporto 1:2 [25].

Le cause necessarie della celiachia sono:

1. la presenza dei geni predisponenti legati al sistema di istocompatibilità (MHC);
2. l'ingestione di cereali contenenti glutine (frumento, orzo e segale), essendo la gliadina A la principale responsabile della malattia celiaca [24].

L'unica via di esposizione al glutine in grado di attivare la malattia è quella intestinale, le vie di innesco delle reazioni IgE immune-mediate sono diverse e includono anche il sistema respiratorio, la cute e le mucose, come descritto anteriormente in precedenza.

Il rapporto tra l'ingestione del glutine e la sua "tossicità" negli individui atopici è ben nota, e questo ha costituito il fondamento per l'inserzione del glutine e della celiachia nella

legislazione alimentare al fine di prevenirne i danni sui pazienti celiaci (Regolamento (UE) n°1169/2011).

La dieta senza glutine è l'unica terapia disponibile per la Celiachia, va eseguita con rigore per tutta la vita. E' importante notare che non ci sono dati clinici definitivi relativi alla dose soglia di glutine in grado di provocare la malattia in pazienti celiaci. Il limite attuale del *Codex Alimentarius* è di 20 mg di glutine / kg (20 ppm) di alimento, che corrispondono a circa 3 grammi di pane. Questo valore soglia può variare di individuo a individuo.

La Celiachia se non viene trattata può portare a complicanze anche drammatiche, come il linfoma intestinale [25].

## 4. Allergeni Vegetali

Allergeni di origine vegetali sono presenti in alcuni alimenti quali legumi (arachide, soia e lupino), cereali contenenti glutine (grano, segale ed orzo), una grande diversità di noci (anacardo, mandorla, noce comune, nocciola), numerose verdure o semi vegetali (sedano, senape, sesamo,) e alcuni frutti (mela, pesca).

Gli allergeni alimentari sono generalmente glicoproteine con peso molecolare compreso tra 10 e 70 kDa, ma esistono anche molte glicoproteine oligomeriche con elevato peso molecolare, >200 kDa. Gli allergeni presentano caratteristiche biochimiche comuni, quali, resistenza al calore, ad agenti denaturanti e all'azione delle proteasi gastriche (pH 1-3), e una discreta solubilità [10], [26].

Aalberse (2000), afferma che le proteine allergeniche possiedono almeno due delle seguenti proprietà:

- capacità di legarsi in maniera specifica agli anticorpi IgE;
- capacità di indurre la sensibilizzazione del sistema immunitario;
- capacità di provocare una reazione allergica.

Bisogna sottolineare che non tutte le proteine possiedono questi prerequisiti, e vengono denominati allergeni completi solo quelle proteine che li possiedono tutti.

Affinché una proteina allergenica possa stimolare la produzione di anticorpi IgE, essa deve contenere nella sua struttura degli epitopi specifici. Gli epitopi sono piccole porzioni di una proteina costituiti da una sequenza di 8-10 amminoacidi, esposti sulla superficie della struttura proteica, che sono riconosciuti dai linfociti T e B e dalle cellule presentatrici dell'allergene. Il complesso che si forma

stimola una serie di reazioni crociate fino ad arrivare ad una reazione infiammatoria vera e propria. A seconda della continuità o meno della sequenza di amminoacidi, gli epitopi possono essere classificati in lineari (continui) o conformazionali (discontinui, ma riuniti spazialmente grazie al fatto che la proteina presenta una struttura ripiegata) [16].

## 4.1 Classificazione delle proteine allergeniche vegetali in famiglie e superfamiglie

Per convenzione, la nomenclatura delle proteine allergeniche è composta dalle prime tre lettere che rappresentano il genere vegetale a cui appartiene, seguito dalla prima lettera del nome della specie (secondo il sistema tassonomico) e per ultimo un numero arabo che esprime l'ordine cronologico in cui è stato identificato e caratterizzato [esempio: allergene Ara h 2, prolamina, nel caso dell'arachide] [23].

Grazie ai progressi scientifici e tecnologici nei campi della proteomica e dell'ingegneria genetica, è stato possibile identificare la struttura tridimensionale e la sequenza amminoacidica di numerose proteine allergeniche. Sulla base delle somiglianze, attualmente, le proteine allergeniche sono raggruppate in famiglie e superfamiglie [15].

Secondo Breiteneder (2016), le proteine appartenenti ad una stessa famiglia possiedono funzioni biologiche e caratteristiche immunologiche correlate, nonché sequenze omologhe di amminoacidi [27].

Le quattro famiglie/superfamiglie di proteine allergeniche più importanti sono:

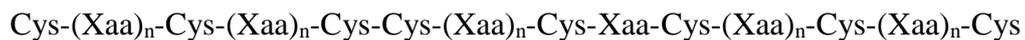
- superfamiglia delle Prolamine;
- superfamiglie delle Cupine;
- superfamiglia Bet v 1 o PR-10;
- famiglia delle Profiline.

## Superfamiglia delle Prolamine

La scoperta di queste proteine è datata nel 1745. Sono state isolate e studiate dal Professore Jacopo Beccari dell'Università di Bologna che le ha denominate “*glutinin*”, e corrispondono al glutine del frumento [28].

Le prolamine sono un'importante fonte di proteine presente negli alimenti maggiormente consumati dall'uomo e dall'animali.

Hanno caratteristiche particolari, quali, basso peso molecolare, insolubilità in acqua e solubilità in soluzione alcool/acqua. Inoltre, presentano un elevato contenuto di glutammine e proline, contengono 6-8 residui conservati di cisteine, mostrano ripiegamenti tridimensionali simili e sono ricche di  $\alpha$ -eliche stabilizzate da ponti disolfuro (S-S) che conferiscono una struttura globulare.



Formula 1- Struttura delle prolamine. Si noti che le prolamine presentano nella loro struttura un modello conservato caratterizzato da otto residui di cisteina (Cys) [15].

Le prolamine sono le principali proteine di deposito nel seme e per questo, inizialmente, si pensava che si trovassero solamente nei cereali [15].

A questa superfamiglia appartengono le “sottofamiglie” di allergeni vegetali più importanti: le 2S albumine, le proteine non-specifiche di trasferimento lipidico (ns-LTP, in inglese), le proteine inibitrici dell' $\alpha$ -amilasi (tripsina nei cereali) e le prolamine dei cereali.

### 2S Albumina

Sono proteine di deposito presenti nei semi delle piante mono e dicotiledoni che le utilizzano come fonte di nutrienti (amminoacidi e scheletro di carbonio) fondamentali nella crescita e durante la germinazione del seme. Sono sintetizzate come polipeptidi a catena singola con peso molecolare di circa 12-14 kDa. Come tutte le albumine, sono solubili in acqua e quando vengono scaldate coagulano. Il contenuto di cisteina in queste proteine è compreso tra 6-13 % del loro peso, ma possono anche essere costituite da metionina (le proteine 2S della noce Brasiliana contengono il 17 % di metionina) [29].

La Figura 5 raffigura la tipica mappatura dei legami disolfuro tra i residui di cisteine presenti nelle albumine 2S. La struttura proteica, formata da due subunità, è altamente conservata ed è caratterizzata

dalla presenza di 8 cisteine distribuite secondo un modello conservato: le cisteine 1 e 2 si trovano nella subunità piccola, le altre cisteine sono presenti nella subunità grande (Cys 3 e Cys4 sono consecutive nella catena polipeptidica, come anche Cys7 e Cys8, mentre il quinto e il sesto residuo di cisteina sono separati da un altro amminoacido). I legami disolfuro intermolecolari sono quelli formati tra i residui di cisteina 1-5 e 2-3, mentre i ponti intramolecolari sono formati dai residui di cisteina 4-7 e 6-8.

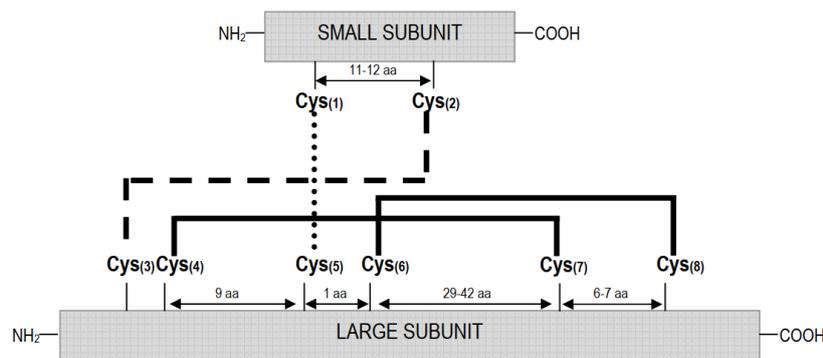


Figura 5- Rappresentazione schematica dei legami disolfuro che si formano tra gli otto residui di cisteina conservati nella famiglia di 2S albumina [29].

Le 2S albumine, in grado di provocare sensibilizzazione attraverso il tratto gastrointestinale, sono presenti in molti noci e semi tra cui le noci Brasiliana e Pecan, la noce comune, le nocciole, l'anacardo, l'arachide, il sesamo, il senape. Queste proteine si trovano anche nei cereali, legumi (soia) e semi oleosi. Le proteine di questa sottofamiglia, ad esempio, l'Ara h 2, l'Ara h 6 e la Bra j 1, sono molto resistenti alla proteolisi da parte della tripsina e della chimotripsina (enzimi digestivi). Inoltre, le 2S albumine sono molto resistenti alle alte temperature e mantengono la loro struttura terziaria anche a 85-90 °C, grazie ai numerosi legami disolfuro che le stabilizzano riducendo l'entropia conformazionale. Altri studi hanno dimostrato che le proteine 2S presenti nella noce Brasiliana, nella soia e nel sesamo, mantengono la loro struttura tridimensionale in condizioni acide [29].

### *ns-LTP*

Le proteine di trasferimento lipidico sono proteine extracellulari con un peso molecolare di circa 7-9 kDa. Le loro funzioni non sono ben chiare, ma sembra che siano in grado di conferire resistenza alle piante a stress biotici ed abiotici. Sono presenti soprattutto nelle parti esterne degli organi delle piante, come per esempio, nella buccia della frutta, nello strato esterno dei semi, sulla superficie del polline, e sono subito disponibili alle nostre cellule nella fase di digestione [15].

La loro struttura è costituita da residui conservati di cisteina, tenuti insieme da 4 ponti disolfuro intramolecolari che formano un canale idrofobico. Questa caratteristica strutturale conferisce stabilità, resistenza alla digestione da parte di proteasi e resistenza al calore [30].

Le ns-LTP allergeniche sono maggiormente presenti nella frutta (mela, pesca, albicocca), nelle noci, nei semi e nelle verdure.

### *Inibitori dell' $\alpha$ -amilasi*

Queste proteine, appartenenti alla famiglia *Triticacea*, sono sintetizzate nell'endosperma della pianta e sono polipeptidi con peso molecolare di circa 12-16 kDa. Gli amminoacidi maggiormente presenti sono la glutammina, l'asparagina e residui di prolina, con 4 o 5 legami disolfuro che conferiscono stabilità. Sono proteine solubili in soluzioni saline e in soluzioni alcool/acqua.

Inoltre, gli inibitori dell'alfa amilasi esogena sono proteine stabile e resistenti al calore, a pH estremi, e all'azione delle proteasi. La loro funzione inibitoria consiste nel fatto che le  $\alpha$ -amilasi e le proteasi non sono in grado di catalizzare le reazioni d'idrolisi dei legami glucosidici presenti negli amidi ed in altri carboidrati, impedendone la digestione da parte dell'intestino degli insetti. Il ruolo naturale, quindi, è una forma di difesa delle piante nei confronti di numerosi insetti.

Tali inibitori si trovano maggiormente negli organi di riserva quali i semi delle Leguminose, nei tuberi di patate e nei cereali (grano riso, orzo, segale) [30].

### *Prolamine dei cereali*

Le prolamine dei cereali sono ricche di zolfo e presentano un dominio N-terminale con un elevato contenuto di prolina e glutenina (motivi ripetuti), e un dominio C-terminale responsabile dei legami disolfuro intramolecolari [31].

Queste proteine sono le principali proteine di riserva dell'endosperma dei semi dei cereali e sono chiamate Glutenine e Gliadine nel frumento, Secaline nel riso, Ordeine nell'orzo, Avenine nell'avena. Sono suddivise in Gliadine, se solubili in soluzione alcol/acqua e caratterizzate da un peso molecolare compreso tra 20-70 kDa, e Glutenine, ad alto peso molecolare, se invece sono solubili in soluzioni diluite di acidi ed alcali [32].

## Superfamiglie delle Cupine

Il nome di questa superfamiglia di proteine deriva dal latino: *cupa = piccolo barile*. Infatti, la loro struttura è caratterizzata da due brevi motivi di sequenza conservati  $[G(X)_5HXH(X)_3,4E(X)_6G]^2$  e  $[G(X)_5PXG(X)_2H(X)_3N]$  ed una struttura centrale. La struttura a barile è dovuta alla presenza di due foglietti  $\beta$ . Appartengono a questa superfamiglia le proteine di riserva (globuline), che si trovano nelle noci e nei legumi. Le globuline sono divise in due gruppi: viciline (globuline 7S) e legumine (globuline 11S) [15].

Le viciline hanno una struttura omo-trimerica con peso molecolare di circa 150-190 kDa. Non presentano residui di cisteina e, quindi, non si possono stabilire dei ponti disolfuro intramolecolari. Le legumine sono, invece, proteine esameriche costituite da sei subunità  $\alpha\beta$ , ognuna formata da un polipeptide acido di circa 30-40 kDa ed un polipeptide basico di circa 20 kDa, legati tra di loro da un legame disolfuro [31].

Le globuline si trovano maggiormente nell'arachide, nella soia, nelle lenticchie, nelle noci, nella nocciola e nel sesamo.

## Superfamiglia Bet v 1 o PR-10

Le proteine di questa superfamiglia sono espresse dalle piante in seguito ad attacco di patogeni, stress e stimoli abiotici e, per tale motivo, sono incluse nella famiglia delle Pathogenesis-related Proteins (PRP) perché presentano caratteristiche omologhe, come basso peso molecolare (14-18 kDa), resistenza alle proteasi e stabilità a pH bassi.

Le Bet v 1 si trovano principalmente nel polline della betulla, ma si possono trovare proteine Bet v 1 omologhe nel polline di altre piante, nella frutta (mela, ciliegia) e nelle noci (nocciola), perciò oltre ad innescare la sensibilizzazione per via aerea possono anche causare allergie alimentari (sensibilizzazione per via orale)<sup>3</sup> [31], [15].

## Famiglia delle Profiline

Le profiline, molto diffuse in natura, si trovano nel citosol delle cellule eucariotiche e sono solubili in soluzioni saline. Presentano una struttura globulare compatta composta da un foglietto  $\beta$

---

<sup>2</sup> X sta per un qualsiasi amminoacido

<sup>3</sup> Tramite reazioni crociate. Sarà discusso più avanti.

antiparallelo circondato da  $\alpha$ -eliche su entrambi i lati [23]. Hanno un peso molecolare compreso tra 12-15 kDa e la loro principale funzione nelle piante è quella di legare l'actina controllandone la polimerizzazione in filamenti, durante vari processi come la citochinesi, l'allungamento cellulare e la crescita dei tubi pollinici [30]. Si trovano nelle piante da fiori, quali, l'arachide, la mela e il sedano.

## 5. Allergenicità delle proteine vegetali

La maggiore allergenicità delle proteine vegetali, ossia la capacità di indurre anticorpi IgE come risposta immunologica, è riscontrata nelle proteine di riserva e in quelle con funzione protettiva [33].

Secondo il database *WHO/IUIS SubCommittee on Allergen Nomenclature* (ultima versione aggiornata il 10 Febbraio 2019) le proteine allergeniche identificate sono 853, appartenente a 384 specie [34]. Le proteine allergeniche vegetali rappresentano solo il 2% di tutte le famiglie di proteine conosciute [3].

Sebbene finora non si riesca a rispondere con certezza alla domanda “Perché alcune proteine sono allergeniche?”, alcuni risultati ottenuti in laboratorio hanno dimostrato che, sia le proprietà strutturali che le proprietà funzionali conservate delle proteine, contribuiscono all'allergenicità [35], [36], [15]. Alcune proprietà che contribuiscono a dare stabilità alle proteine sono:

- struttura 3D compatta (globulare) stabilizzata da legami idrogeno e ponti disolfuro;
- presenza di modificazioni post-traduzionali come la N-glicosilazione,
- la conformazione del sito di legame (a cavità o a forma di un barile).

Le caratteristiche strutturali, insieme all'elevata quantità e alla resistenza alle proteasi durante la digestione, fanno sì che le proteine allergeniche rimangano intatte, diventando ottimi candidati per sensibilizzare il sistema immunitario [23]. Tuttavia non è chiaro se queste caratteristiche siano gli unici fattori che rendono determinate proteine allergeniche.

### 5.1 Effetto dei processi di lavorazione nell'allergenicità

Un alimento, a seconda dalle tradizioni ed ambiente socio-economico, viene trasformato e preparato in vari modi diversi, con l'obiettivo di migliorarli l'aspetto, la consistenza e il sapore ed il gusto. Inoltre, la lavorazione degli alimenti garantisce anche la sicurezza contro i microbi e le tossine, oltre a migliorarli la durata di conservazione. Le trasformazioni che subiscono gli alimenti possono essere realizzati a casa, nell'industria o nei ristoranti.

L'effetto dei processi di lavorazione degli alimenti sull'allergenicità dipende da vari fattori quali il tipo e l'intensità della lavorazione, l'effetto della matrice alimentare, il tipo e la stabilità delle proteine e gli epitopi identificati dalle IgE di un determinato individuo.

I processi di trasformazione degli alimenti possono essere termici (essiccazione, tostatura, frittura, sbiancamento, riscaldamento a infrarossi, riscaldamento a microonde e altri trattamenti termici) e non termica (fermentazione, irradiazione e filtrazione).

Le tecniche di lavorazioni a caldo (bollitura, cottura in forno, frittura) influenzano le proprietà strutturali e chimiche delle proteine che sono particolarmente sensibili alla denaturazione [23], [37].

Le modifiche tipiche che possono occorrere sono:

- ✓ **Strutturali:** la proteina prima perde la sua struttura terziaria (eventualmente è reversibile), dopodiché perde la struttura secondaria ( $\alpha$ -eliche e foglio- $\beta$ ) (55-70 °C), e poi si scindono i legami disolfuro (70-80 °C). Questi cambiamenti strutturali fanno sì che la proteina si debba riorganizzare tramite: formazione di nuove interazioni inter/intramolecolari; formazione di aggregati stabili (90-100 °C) e stabilimento di nuovi legami disolfuro (80-90 °C) [23], [38]. Ciò riflette un passaggio progressivo verso una struttura disorganizzata, con conseguente denaturazione delle proteine, che adottano una conformazione a spirale casuale spiegata [39].
  
- ✓ **Chimiche:** in presenza di zuccheri (aldeidici o chetonici) nella matrice alimentare si possono sviluppare delle interazioni tra i gruppi carbonilici degli zuccheri ed i gruppi amminici liberi delle proteine (principalmente lisina ed arginina), con conseguente blocco di questi ultimi – reazione di Maillard o glicosilazione non enzimatica. Questa reazione comporta la reticolazione (gel) delle proteine [38]. Ad alte temperature (100-125 °C e oltre), altre modifiche chimiche possono anche verificarsi come ad esempio la formazione di legami covalenti tra i residui di lisina e altri costituenti della matrice alimentare, portando a vari addotti [39].

Tuttavia, non è lineare l'effetto dei processi di trasformazione sull'allergenicità degli alimenti, ed il processo di lavorazione può condurre ad alterazioni nella struttura delle proteine allergeniche, affettando la loro allergenicità come effetto indiretto.

Durante i trattamenti termici una volta che comporta allo spiegamento delle proteine, gli epitopi conformazionali responsabili dell'allergenicità sono generalmente distrutti, mentre quelli lineari

possono essere mantenuti e altri, nascosti nella conformazione nativa, possono essere esposti in superficie.

In molti casi l'allergenicità viene distrutta con i trattamenti termici, però in molti altri rimane inalterata o addirittura può essere aumentata [23].

Alcuni allergeni, sono stabili alle alte temperature, ad esempio, gli allergeni appartenenti alla superfamiglia delle Prolamine, come le 2S albumina presenti nelle noci Brasiliane (Ber e 1) e nel sesamo (Ses i 1) e le ns-LTP della mela (Mal d 3) e dell'uva (Vit v 1). Nelle proteine dell'arachide, Ara h 1 e Ara h 2, le reticolazioni creano degli aggregati di elevato peso molecolare che si legano agli anticorpi IgE in maniera molto più specifica e, sono molto più resistenti alla digestione nel tratto gastrointestinale. Altri allergeni invece sono labili, come per esempio, quelli della famiglia Bet v 1 che si trovano nella frutta e verdura. L'allergenicità di queste proteine viene abbattuta quando cotti [38]

Johnson *et al.*, 2010 studiano gli effetti dell'alta pressione sulle proteine dell'arachide (Ara h 2 e Ara h 6), hanno dimostrato che la loro struttura rimane invariabile dopo l'applicazione di una pressione di 700 MPa a 20 °C e 80 °C [23].

La conoscenza dell'effetto del processo di trasformazione nell'allergenicità può essere utile per stabilire i parametri del processo, quali, temperatura, pressione, pH, efficaci nel ridurre l'allergenicità, il che migliorerebbe la gestione del rischio allergenico degli alimenti.

## 5.2 Reazioni crociate tra gli allergeni

Certi allergeni vegetali, oltre ad essere considerati sensibilizzatori primari dell'allergia alimentare, possono generare reattività crociate con altre proteine appartenenti alla stessa famiglia, ossia in specie che sono tassonomicamente vicine.

Allergeni di Classe I sono quelli che *in vitro* hanno dimostrato essere i più resistenti alla denaturazione da parte degli enzimi digestivi e del calore e sensibilizzano il sistema immunitario di soggetti atopici dando luogo a reazioni allergiche alimentari. Di contro, gli allergeni di Classe II sono termolabili e subiscono l'azione delle proteasi digestive, quindi ci si aspetta che non siano capaci di sensibilizzare l'apparato gastrointestinale. E' stato dimostrato, invece, che gli allergeni di Classe II, a seconda della loro resistenza ai processi digestivi, possono comunque sensibilizzare l'apparato gastrointestinale (allergia alimentare) in individui sensibilizzati precedentemente per via aerea, come per esempio, individui che presentano l'allergia al polline [31], [40].

L'omologia strutturale (basso peso molecolare e sequenze simili di amminoacidi) che esiste tra le varie famiglie di proteine può dare luogo a fenomeni di reattività crociata. La FAO/WHO (2001) ha stabilito che due proteine allergeniche possono essere considerate omologhe se hanno almeno il 35% di identità della sequenza amminoacidica. Queste proteine omologhe hanno una grande probabilità di cross-reagire e stimolare una risposta immunitaria [15], [31].

	1			*		50
Bet v 1a	MGVFN <del>Y</del> ETET	TSVIPAARLF	KAFILDGDNL	FPKVAPQAIS	SVENIEGNGG	
Api g 1	MGVQTHVLEL	TSSVSAEKIF	QGFVIDVDTV	LPKAAPGAYK	SVE.IKGDGG	
Dau c 1.2	MGAQSHSLEI	TSSVSAEKIF	SGIVLDVDTV	IPKAATGAYK	SVE.VKGDGG	
Pyr c 1	MGLYTFENEF	TSEI <del>PP</del> RLF	KAFVLDADNL	IPKIAQAIAK	HAEILEGNGG	
Mal d 1	MGVYTFENEF	TSEI <del>PP</del> SRLF	KAFVLDADNL	IPKIAQAIAK	QAEILEGNGG	
Pru av 1	MGVFTYESEF	TSEI <del>PP</del> RLF	KAFVLDADNL	VPKIAQAIAK	HSEILEGDGG	
Consensus	**-----*	**-----*	-----*--	---*---*--	-----*--	-----*--
	51		*			100
Bet v 1a	P <del>G</del> TIKKISFP	EGFPFKYVKD	RVDEVDHTNF	KYNYSVIEGG	PIGDTLEKIS	
Api g 1	P <del>G</del> TLKIITLP	DGGPITMTL	RIDGVNKEAL	TFDYSVIDGD	ILLGFIESIE	
Dau c 1.2	AGTVRIITLP	EGSPITMTV	RTDAVNKEAL	SYDSTVIDGD	ILLGFIESIE	
Pyr c 1	P <del>G</del> TIKKITFG	EGSQYGYVKH	RVDSIDEASY	SYAYTLIEGD	ALD <del>T</del> IEKIS	
Mal d 1	P <del>G</del> TIKKITFG	EGSQYGYVKH	RIDSIDEASY	SYSYTLIEGD	ALD <del>T</del> IEKIS	
Pru av 1	P <del>G</del> TIKKITFG	EGSQYGYVKH	KIDSIDKENY	SYSYTLIEGD	ALGDTLEKIS	
Consensus	---*---*--	-----*--	-----*--	-----*--	-----*--	-----*--

Figura 6 - Allineamento delle sequenze di amminoacidi degli omologhi Bet v 1 e Bet v 1a (i residui di amminoacidi conservati sono contrassegnati da un asterisco). Un motivo conservato (P-loop) è contrassegnato (regione ombreggiata) insieme ai residui di lisina fiancheggiati [37]

Gli anticorpi IgE sono specifici e si legano con grande affinità agli allergeni che ne hanno indotto la produzione. Tuttavia, le proteine appartenenti ad una stessa famiglia possono contenere degli epitopi simili che vengono riconosciuti dalle IgE diventando, quindi, capaci di indurre una risposta immunitaria, dando luogo a reazioni crociate [40].

Un esempio di reazione crociata molto comune è quella che si verifica tra le proteine della superfamiglia Bet v 1 (Bet v1 è il maggiore allergene del polline di betulla) che provocano cross-reazione con le proteine omologhe presenti in altre piante appartenenti alla famiglia delle *Rosaceae* (mela) e nelle verdure che appartengono alla famiglia delle *Apiaceae* (sedano e carota) [40]. Il 70% dei soggetti che soffrono di allergia ai polline presentano, infatti, anche un'allergia a questi alimenti [15].

Un altro esempio importante riguarda i crostacei. Le proteine allergeniche dei crostacei presentano una identità strutturale molto pronunciata, il che fa sì che un individuo allergico ai gamberetti abbia circa il 75% di probabilità di avere una reazione allergica al granchio o all'aragosta [10].

Nella tabella sottostante sono riportate le più importanti famiglie di proteine allergeniche che danno luogo a reattività crociata tra gli allergeni del polline e gli allergeni alimentari. Adattato da [40].

Allergen components families (sensitivity to heat and proteases)	Examples of relevant allergen components involved (allergen sources)
PR-10 proteins, Bet v 1 homologues (sensitive to heat and digestion)	Bet v 1, Aln g 1 (tree pollen) Mal d 1, Pru p 1, Api g 1, Gly m4 (fruits, vegetables, legumes)
Profilins, Bet v 2 homologues (sensitive to heat and digestion)	Bet v 2, Ole e 2 (tree pollen), Che a 2, Art v 4, Amb a 8 (weed pollen) Api g 4, Dau c 4, Pru p 4, Cuc m 2, Mus xp 1, Sin a 4 (vegetables, fruits, seeds)
Lipid transfer proteins (stable to heat and digestion)	Pla a 3, Ole e 7, Art v 3, Amb a 6 (tree and weed pollen) Api g 2, Pru p 3, Cuc m LTP, Mus a 3, Sin a 3 (vegetables, fruits, seeds)
Tropomyosins (stable to heat and digestion)	Der p 10, Bla g 7 (house dust mites, insects) Pen m 1, Myt e 1 (crustaceans, mollusks)
Serum albumins (fairly sensitive to heat and digestion)	Fel d 2, Can f 3, Equ c 3 (cat, dog and horse serum albumins) Bos d 6, Sus s 6 (bovine and porcine serum albumins)

Tabella 1- Principali famiglie di proteine allergeniche e allergeni più importanti associati a reazioni crociate.

## 6. Alcuni alimenti allergenici

### 6.1 Frutta a guscio

Per frutta a guscio (o semplicemente noci) si intende generalmente un seme di una pianta le cui pareti diventano dure quando i semi sono maturi. Tra i frutti a guscio i più noti sono: l'anacardo (*Anacardium occidentale*), le mandorle (*Prunus spp.*), la noce comune (*Juglans regia*), la noce Brasiliana (*Bertholletia excelsa*), la nocciola (*Corylus avellana*), la noce di macadamia (*Macadamia integrifolia*), la noce Pecan (*Carya illinoensis*), il pinolo (*Pinus spp.*) ed il pistacchio (*Pistacia vera*). Il cocco (*Cocos nucifera*) è considerato una noce commestibile.

#### Composizione chimica

La maggior parte delle noci commestibili presenta un elevato contenuto di lipidi, che varia tra il 26.1% (noce di cocco) ed il 75.8% (noce di macadamia), essendo per la maggior parte monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA), con il contenuto di acidi grassi saturi (SFA) molto basso. Le PUFA e le MUFA maggiormente presenti nelle noci sono gli acidi linoleici e  $\alpha$ -linolenici, e gli acidi oleici, con 18 atomi di Carbonio. Inoltre, le noci contengono una serie di nutrienti essenziali e sostanze fitochimiche, tra cui carotenoidi, polifenoli e tocoferoli che possiedono funzioni antiossidanti ed altre

bioattività [37]. La composizione chimica della frutta a guscio è influenzata dal tipo di cultivar, dalle condizioni di crescita e dall'area geografica.

## Consumo e benefici per la salute

I frutti a guscio possono essere consumati in svariate forme: intere (crude, tostate e/o salate), come ingredienti in alimenti processati, come creme spalmabili, prodotti da forno, dolci e tanti altri. Inoltre, si possono consumare come oli per frittura e condimento. Trovano altrettanto uso nell'industria della cosmetica. È noto che i frutti a guscio, oltre ad avere un alto apporto calorico (570-720 kcal/100 g), sono fonti sane di acidi grassi mono e polinsaturi, hanno molte proprietà nutrizionali quali: proteine, minerali e vitamine, ed ad un'elevata capacità di assorbimento dei radicali di ossigeno e attività antiossidanti. L'Organizzazione Mondiale della Sanità, tenendo in considerazione risultati di vari studi che comprovano la riduzione dei rischi delle malattie croniche con il consumo di frutta a guscio (ad esempio: studio fatto da Hu e Stampfer, 1999), ha dimostrato che un consumo diario di 30 g al giorno comporta vari benefici per la salute, come l'abbassamento del colesterolo, della glicemia e dei trigliceridi, con conseguenti effetti positivi contro le malattie croniche, quali, malattie cardiovascolari, obesità, diabete di tipo 2 e tumori [37]. La produzione e consumo di frutta a guscio è aumentata considerevolmente negli anni, rappresentando un aumento di consumo del 2,3 di sterline pro capite tra 1980 e 2015 [41].

## Allergia

Tuttavia, le noci sono dei “veleni” per una piccola parte della popolazione mondiale, che non può fare altro che evitarli nella loro dieta. Le noci sono considerati allergeni potenti e per questo sono stati messi nella lista dei otto principali alimenti che provocano le reazioni allergiche IgE immuno-mediate. Al contrario degli altri alimenti, l'allergia alle noci dura per tutta la vita [37]. La loro assunzione, anche se in piccola quantità, induce la produzione degli anticorpi IgE specifici contro l'allergene presente naturalmente nelle noci, ed una volta legati vanno ad attivare le cellule dei mastociti che si degranulano rilasciando delle molecole infiammatorie come l'istamina, come discusso in precedenza.

È difficile dare un numero alla prevalenza dell'allergie causate dalle noci una volta che i dati usati per calcolarla variano a seconda dell'età, area geografica ed in molti casi dipendono dall'autodiagnosi degli individui e in pochi sono state valutati tramite i test standardizzati usati per la diagnosi delle allergie (misura delle IgE specifiche del siero, skin prick test e *oral food challenges*-OFC). Tuttavia,

si può stimare che la prevalenza delle reazioni allergiche alla frutta a guscio sia circa 0,05-7,3 % a livello globale [41].

## 6.2 Arachide

L'arachide (*Arachis hypogaea*) non viene considerata una frutta a guscio ma ha molte somiglianze nutrizionale con essa. Sono largamente e principalmente coltivate in India, Cina e negli Stati Uniti. L'arachide è un seme che cresce in baccelli sottoterra ed appartiene alla famiglia delle *Leguminosae*. Grazie alle sue ottime proprietà digestive, l'arachide è consumato sia crudo che fresco, tostato e/o salato, come olio per frittura, e si trova spesso come ingrediente in dolci e creme spalmabili [23]

L'allergia all'arachide è considerato un grave problema di salute pubblica, che affetta circa l'1% della popolazione, con circa 3 milioni di persone affettati solo negli Stati Uniti. L'arachide ha un elevato potenziale allergico e, sono sufficiente una piccola quantità di questo alimento (100 µg) per innescare lievi a gravi reazioni allergiche nelle persone atopiche [42]. Quindi, tracce di arachide per possono essere presenti in un alimento trasformato può essere molto pericoloso per la vita delle persone che presentano un'allergia all'arachide. Finora sono stati identificati otto proteine allergeniche delle arachidi: Ara h 1 ad Ara h 8.

## 6.3 Soia

I semi di soia (*Glycine max*) appartengono alla famiglia delle *Fabaceae* e sono originari dell'Asia. La soia è considerata una ricca fonte di nutrienti come proteine, carboidrati, sali minerali e grassi sani (omega 3 e omega 6). Una volta che rappresenta una fonte alimentare molto economica, le proteine della soia sono molto utilizzate nell'industria di trasformazione alimentare [7].

Il consumo di soia, come succede per le noci, comporta vari benefici alla salute. Nel 1999, la FDA ha riconosciuto un legame tra il consumo di 25 g di proteina di soia al giorno con la diminuzione del rischio di malattie cardiovascolari [7].

La prevalenza e l'incidenza dell'allergia alla soia nella popolazione generale sono sconosciute e dipendono probabilmente dalle abitudini alimentari locali e dall'esposizione. Al contrario dell'allergia alla frutta a guscio ed all'arachide, l'allergia alla soia è passeggera, scompare alle età di 3 anni [23].

## 6.4 Sesamo

I semi di *Sesamum indicum* appartengono alla famiglia *Pedaliaceae*, originari dall'Africa. I semi di sesamo si mangiano interi o decorticati, secchi o tostati, e vengono quasi sempre utilizzati come ingrediente per fare biscotti, zuppe, salse, eccetera [23].

Non esiste finora studi completi che documentino la prevalenza dell'allergia al sesamo. Dati sulla prevalenza basati su autodiagnostico indicano una prevalenza compresa tra 0.07-1.5% (studi effettuati maggiormente nell'infanzia) [23].

Numerose proteine allergeniche del sesamo sono state identificate in grado di indurre cross reattività, tra queste particolarmente critica è Api g 1, responsabile di reazioni crociate con il polline della betulla (*Bet v 1*) e con altri vegetali (mela e carota). La cross reattività può esistere anche con i vari tipi di noci [7].

## 6.5 Senape e colza

Le specie vegetali appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae* possono essere fonti di contaminazione della farina di frumento (*Triticum aestivum*). La cross-contaminazione può occorrere durante la raccolta, nello stoccaggio o nei processi di lavorazione del grano.

Non tutte le specie di questa famiglia sono però allergeniche. Tra questi, le senape (senape nera: *Brassica nigra*; senape indiana o bruna: *Brassica juncea*; senape bianca o gialla: *Sinapis alba*) sono ben note come specie allergeniche. Queste specie contengono la proteina allergenica 2S, che può provocare gravi reazioni alla salute in soggetti sensibili.

Nella Tabella 2 sono elencati i principali allergeni che si possono trovare in una grande varietà di noci, legumi e semi analizzati in questo lavoro di Tesi

Fonte alimentare	Specie	Allergene	Superfamiglia/famiglia proteica	Peso molecolare (kDa)
<b>Anacardo</b>	<i>Anacardium occidentale</i>	Ana o 1	7S vicilina	50
		Ana o 2	11S legumina	53
		Ana o 3	2S albumina	12.6
<b>Arachide</b>	<i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 1	7S vicilina	64*
		Ara h 2	2S albumina	17*
		Ara h 3	11S legumina	60
		Ara h 5	Profiline	15
		Ara h 6	2S albumina	15
		Ara h 8	PR-10	15
		Ara h 9	ns-LTP1	9.8
<b>Mandorla</b>	<i>Prunus dulcis</i>	2S albumina	2S albumina	12
		Pru du 3	ns-LTP	9*
		Pru du 4	Profiline	14.06
<b>Nocciola</b>	<i>Corylus avellana</i>	Cor a 1	PR-10	17-18
		Cor a 2	Profiline	14
		Cor a 8	ns-LTP	8
<b>Noce Brasiliana</b>	<i>Bertholletia excelsa</i>	Ber e 1	2S albumina	9*
		Ber e 2	11S legumina	29*
<b>Noce di cocco</b>	<i>Cocos nucifera</i>	Coc n 1	7S vicilina	53*
<b>Noce di macadamia</b>	<i>Macadamia integrifolia</i>	Nessuno allergene identificato finora!		
<b>Noce comune</b>	<i>Juglans regia</i>	Jug r 1	2S albumina	15-16
		Jug r 2	7S vicilina	47
		Jug r 3	ns-LTP	9
		Jug r 4	11S legumina	58.1
		Jug r 5	PR-10	20*
<b>Noce Pecan</b>	<i>Carya illinoensis</i>	Car i 1	2S albumina	10.73
		Car i 2	7S vicilina	55*
		Car i 4	11S legumina	55.4*
<b>Pinolo</b>	<i>Pinus</i>	Pin p 1	2S albumina	6*
<b>Pistacchio</b>	<i>Pistacia vera</i>	Pis v 1	2S albumina	7
		Pis v 2	11S legumina	32
		Pis v 3	7S vicilina	55
<b>Sesamo</b>	<i>Sesamum indicum</i>	Ses i 1	2S albumina	9*
		Ses i 3	7S vicilina	45*
		Ses i 6	11S legumina	52*
<b>Soia</b>	<i>Glycine max</i>	Gly m 1	Proteina idrofobica	7
		Gly m 2	Proteina di difesa	8
		Gly m 5	$\beta$ -conglucina (7S)	63.16*
		Gly m 3	Profiline	14

Tabella 2- Allergeni analizzati nel lavoro di Tesi [41], [37]. (\*) valori riportati sul sito web: <http://www.allergen.org/>.

## 7. Sicurezza alimentare, Etichettatura e Legislazione degli allergeni alimentari

### 7.1 Etichetta

Per etichettatura si intende “qualunque menzione, indicazione, marchio di fabbrica o commerciale, immagine o simbolo che si riferisce a un alimento e che figura su qualunque imballaggio, documento, avviso, etichetta, nastro o fascetta che accompagna o si riferisce a tale alimento” [43]. A causa del fatto che le allergie e le intolleranze alimentari sono in aumento e il rischio per la salute di molti individui può essere elevato, diventa obbligatorio elencare tutti gli ingredienti presenti in un alimento, anche se presenti in tracce. L’obbligo riguarda i cibi preconfezionati, quelli somministrati nei ristoranti o nelle panetterie [43].

I requisiti essenziali che devono avere le etichette degli alimenti sono numerosi: la dichiarazione degli ingredienti deve essere sufficientemente precisa per consentire di evitare componenti alimentari non tollerati e le denominazioni di etichettatura utilizzate devono essere familiari, inequivocabili e non soggette ad incomprensioni. La garanzia che un prodotto alimentare sia sicuro per un consumatore allergico deve essere una responsabilità di tutta la filiera, agricoltori e coltivatori, produttori e trasformatori [44].

È doveroso che la legislazione sull’etichettatura degli allergeni venga rispettata da parte dei produttori e delle aziende di trasformazione dei prodotti. Gli enti di controllo devono garantire ai consumatori che il contenuto del prodotto acquistato sia quello che dichiarato nell’etichetta e quindi, informazioni quali origine geografica e identità delle specie, razze o varietà utilizzate, devono essere elencati in maniera accurata e trasparente. Solo in questo modo si possono fare delle scelte sicure e consapevoli.

### 7.2 Legislazione

Nei Paesi dell’Unione Europea è in vigore il Regolamento (UE) n°1169/2011 (attivo dal 13 Dicembre 2014) che stabilisce regole relative all’etichettatura e all’erogazione di informazione sugli allergeni. L’obiettivo di queste regole è quello di garantire il diritto dei cittadini allergici all’informazione, promuovere il loro benessere, proteggerli da rischi ed evitare che le persone allergiche abbiano un numero inferiore di scelte di prodotti rispetto agli individui non allergici.

Il presente regolamento fornisce una lista di 14 prodotti alimentari di cui deve essere dichiarata la presenza, sia come ingrediente<sup>4</sup> principale, sia come ausiliario alla trasformazione (per esempio si usa la farina di frumento in salse e cibi preconfezionati, il lupino viene usato nel concime per le piante). In particolare, le informazioni obbligatorie che, secondo il Regolamento (UE), devono essere presenti in etichetta sono:

- la designazione della sostanza, presente nella lista dell'allegato II, usata nella produzione o nella trasformazione di un alimento e che è ancora presente nel prodotto finito (*articolo 9*)
- la sostanza elencata va evidenziata con uno stile tipografico differente che lo distingue chiaramente dagli altri ingredienti, per esempio per dimensioni, stile o colore di sfondo (*articolo 21*)
- inoltre, in mancanza della lista di ingredienti, si adotta l'uso del termine "Contiene" seguito dal nome della sostanza allergenica, quando presente nel alimento (*articolo 21*).

1.	Cereali contenente glutine, esempio: grano, segale, orzo, avena, farro, Kamut o i loro ceppi ibridati e prodotti derivati
2.	Crostacei e prodotti a base di crostacei (esempio: aragosta, gamberi, granchi)
3.	Uova e prodotti a base di uova
4.	Pesce e prodotti a base di pesce
5.	Arachidi e prodotti a base di arachidi
6.	Soia e prodotti a base di soia
7.	Latte e prodotti a base di latte (incluso lattosio)
8.	Frutta a guscio, vale a dire: mandorle ( <i>Amygdalus communis</i> L.), nocciole ( <i>Corylus avellana</i> ), noci ( <i>Juglans regia</i> ), noci di acagiù ( <i>Anacardium occidentale</i> ), noci di pecan [ <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch], noci del Brasile ( <i>Bertholletia excelsa</i> ), pistacchi ( <i>Pistacia vera</i> ), noci macadamia o noci del Queensland ( <i>Macadamia ternifolia</i> ), e i loro prodotti
9.	Sedano e prodotti a base di sedano
10.	Senape e prodotti a base di senape
11.	Semi di sesamo e prodotti a base di semi di sesamo.
12.	Anidride solforosa e solfiti in concentrazioni superiori a 10 mg/kg o 10 mg/litro in termini di SO <sub>2</sub> totali
13.	Lupini e prodotti a base di lupini
14.	Molluschi e prodotti a base di molluschi

Tabella 3- Lista delle 14 sostanze (e prodotti) che provocano allergie o intolleranza alimentare e che devono essere obbligatoriamente presenti nell'etichetta in base al Regolamento (UE) N° 1169/2011, Allegato II. Questa lista è soggetta a modifiche ed aggiornamenti continui. Fonte: [43].

<sup>4</sup> Ingrediente "qualunque sostanza o prodotto, compresi gli aromi, gli additivi e gli enzimi alimentari, e qualunque costituente di un ingrediente utilizzato nella fabbricazione o nella preparazione di un alimento e ancora presente nel prodotto finito, anche se sotto forma modificata" [43].

Di seguito è riportato un esempio di come deve essere presente nell'etichetta una sostanza allergenica secondo il Regolamento (UE): Aromi (**mandorle**), Tofu (**soia**), Orzo (**glutine**).

### 7.3 Allergeni nascosti

I consumatori con allergie alimentari possono affidarsi solamente alla lista di ingredienti presenti nel prodotto che acquistano: essa deve essere accurata e completa, così da evitare i prodotti a cui è allergici [15]. A causa dell'impossibilità attuale di correlare una dose minima individuale di allergene con il rischio di induzione delle IgE e conseguente stimolazione delle cellule *Th2*, l'unico trattamento profilattico è quello di evitare l'alimento specifico (ad esempio arachide, mandorle) e gli alimenti trasformati dove l'allergene è presente come ingrediente (come merendine, creme spalmabili, salse preconfezionate, eccetera).

Il Regolamento (UE) n°1169/2011 ha normalizzato le leggi sull'etichettatura obbligatoria delle sostanze o prodotti elencati nella Tabella 3, ma non ha stabilito l'obbligo di elencare queste sostanze quando esse sono presenti in maniera "nascosta", ossia quando si ha il sospetto della loro presenza o quando presenti non deliberatamente negli alimenti [45].

Può succedere che un alimento venga contaminato accidentalmente dalla presenza di un allergene durante le fasi produttive; di conseguenza l'allergene è presente in forma "nascosta" nel prodotto finale e non sarà dichiarato in etichetta (cross-contaminazione). Gli incidenti possono essere dovuti a diverse situazioni:

- una non adeguata pulizia degli utensili utilizzati per produrre diversi alimenti (ad esempio, uso della stessa affettatrice per taglio di salumi e formaggi)
- contaminazione accidentale durante lo stoccaggio ed il trasporto dei prodotti (materie prima o prodotto finale) [15], [46].

La presenza dell'allergene nascosto può, inoltre, essere dovuta ad errori di etichettatura, ad esempio quando il produttore cambia un ingrediente nella ricetta e non aggiorna tempestivamente l'elenco degli ingredienti. Oppure quando si sostituisce un ingrediente con un altro di minor qualità per motivi economici: in questo caso si tratta di una frode alimentare. Un esempio è la presenza di anacardo al posto del pinolo nel pesto genovese DOP.

## 7.4 Etichettatura precauzionale PAL

Con l'obiettivo di minimizzare il rischio che il consumatore possa entrare in contatto accidentale con l'allergene, molte aziende attualmente adottano in maniera volontaria una "Etichettatura Precauzionale" (*Precautionary Allergen Labelling –PAL*), come avvertimento per i consumatori sugli eventuali rischi di contaminazione di allergeni negli alimenti [47]. La presenza involontaria di un ingrediente allergizzante può essere comunicata usando una delle seguenti diciture: "può contenere tracce di..." oppure "non adatto a" [44].

Un altro strumento che le aziende hanno a disposizione è il programma VITAL (*Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling*), sviluppato in Australia e Nuova Zelanda con l'obiettivo di supportare i produttori di alimenti a gestire le cross-contaminazioni nel corso della produzione alimentare. Questo programma ha stabilito delle dosi di riferimento che servono come guida all'applicazione del PAL, garantendo così che l'uso dell'etichettatura precauzionale sia appropriato al livello di rischio effettivo a cui vanno incontro i consumatori allergici [48]. Se l'ingestione di un alimento può comportare una dose di assunzione di allergeni più elevata rispetto alla dose di riferimento, si consiglia l'etichettatura precauzionale.

Food	Reference dose VITAL (mg of proteins) [27, 34, 37]	Reference dose EAACI (mg of proteins) [38]	Reference dose NVWA (mg of proteins) [28]	Reference dose VITAL (mg of proteins per kg) Portion size: 50 g
Peanut	0.2	0.2	0.015	4
Cow milk	0.1	0.1	0.016	2
Egg	0.03	0.03	0.0043	0.6
Hazelnut	0.1	0.1	0.011	4
Soy	1.0	1.0	0.078	20
Wheat	1.0	1.0	0.14	20
Cashew	2.0	2.0	1.4	40
Mustard	0.05	0.05	0.022	1
Lupin	4.0	4.0	0.83	80
Sesame	0.2	0.2	0.10	4
Shrimp	10	10.0	3.7	200
Fish	/	0.1	/	/

Figura 7 – Dosi di riferimento di diversi alimenti allergizzanti [48].

Il Sistema di Allerta Rapido per Alimenti e Mangimi nei paesi UE (RASFF, *Rapide Alert System for Food and Feed*) è stato creato dal Consiglio europeo per facilitare la comunicazione rapida di informazioni sui pericoli collegati all'ingestione di prodotti alimentari. Infatti, nonostante tutti gli sforzi dei produttori a mettere in pratica le norme di buona fabbricazione (GMP, *Good Manufacturing Practice*), è quasi impossibile evitare la cross-contaminazione. Ogni anno ci sono molte segnalazioni

che riguardano gli allergeni non dichiarati in etichetta. Nel 2018, ad esempio, ci sono state 169 notificazioni. Nel grafico sono riportate le segnalazioni della presenza di allergeni, non dichiarati in etichetta, nel quadriennio 2014-2018.

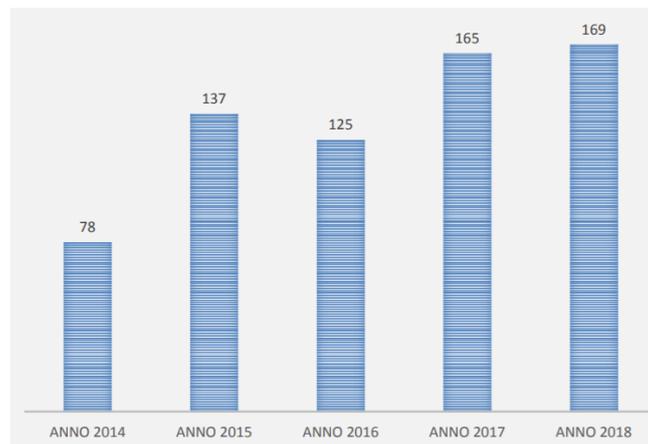


Figura 8- Numero di segnalazioni riguardanti la presenza di allergeni non dichiarati nell' etichetta dei prodotti (2014-2018). Fonte: RASFF/Ministero della Salute.

## Richiamo di un prodotto

Viene in seguito riportato la procedura di richiamo di prodotti segnalati, quando c'è il sospetto che il prodotto sia stato contaminato da un allergene che non è dichiarato in etichetta.

*“Una volta ricevute le informazioni relative ad un determinato prodotto a rischio, l'autorità competente locale (Regione e ASL) provvede a vigilare sull'effettiva attuazione, da parte del produttore e di altri operatori della catena agro-alimentare eventualmente coinvolti, delle misure di ritiro e/o richiamo previste dalla normativa comunitaria per proteggere la salute pubblica. Inoltre, vengono effettuate indagini per accertare le cause all'origine di una contaminazione e intraprendere azioni per assicurare che l'operatore ponga rimedio alla situazione” [49].*

**Motivo del richiamo:**  
**PRESENZA DI ALLERGENI SOIA E SENAPE NON INDICATI IN ETICHETTA**

**Avvertenze:**  
 Si raccomanda ai consumatori ALLERGICI ALLA SOIA E ALLA SENAPE di controllare il prodotto acquistato e se appartenente alla scadenza richiamata, di NON CONSUMARLO e di riportarlo al proprio negoziante che provvederà a sostituirlo o rimborsarlo oltre che a chiarire eventuali dubbi.



**DALLA NOSTRA FILIERA**

**400g e 14.11 oz.**

**CECI biologici**

Può contenere tracce di **glutine**. Conservare in luogo fresco ed asciutto al riparo dalla luce solare diretta. Confezionato in atmosfera protettiva. Ammolto: 12 ore. Rapporto acqua/legume: 6/1. Tempo di cottura: 90 minuti in una casseruola a fuoco basso. Da consumarsi preferibilmente entro il: vedi lato.

**GB - Organic chick peas.**  
 May contain traces of **gluten**. Store in a cool dry place, out of direct sunlight. Packed in a protective atmosphere. Soaking time: 12 hours. Water/beans ratio: 6/1. Cooking time: 90 minutes in a large cooking pot, over a low heat. Best before: see side.

**Valori nutrizionali medi per 100g/Average nutritional values per 100g:**  
 energia/energy 1495 kJ - 355 kcal; grassi/fat 6,3 g, di cui acidi grassi saturi/of which saturates 0,8g; carboidrati/carbohydrate 47g, di cui zuccheri/of which sugars 3,7g; fibre/fibre 14g; proteine/protein 21g; sale/salt 0,02g.

Prodotto per. / Produced for: **EcorNaturaSi SpA**, via L. De Besi 20/C Verona (VR) Italia da: / by: **ILTA Alimentare SpA**, nello stabilimento di via dell'elettricità 19, Venezia (VE) Italia. [www.ecor.it](http://www.ecor.it) - Servizio consumatori: 800-489311

IT-BIO-009  
 Agricoltura Italia  
 Organismo di Controllo autorizzato dal Mipaaff IT-BIO-009  
 Operatore controllato n. D568

**COME DIFFERENZIARE**  
 sacchetto + etichetta  
**PLASTICA**

Non disperdere nell'ambiente. Verifica sempre le modalità di raccolta del tuo Comune.

8 019010 342668

Figura 9 - Esempio di richiamo di un prodotto dove non è dichiarata in etichetta la presenza di allergeni (soia e senape). Si noti la presenza della PAL riferita al glutine. Fonte: Ministero della Salute (30/01/2020).

## 8. Metodi immunoanalitici per la determinazione di allergeni in matrici alimentari

I metodi analitici per il rivelamento degli allergeni nascosti sono molto importanti in quanto permettono di garantire la sicurezza alimentare e la conformità delle etichette, migliorando così la vita dei consumatori allergici.

Due requisiti sono fondamentali nella scelta del metodo analitico per l'identificazione di allergeni in matrici alimentari, specialmente se presente in tracce: sensibilità e specificità [50]. Inoltre, i metodi devono essere affidabili e robusti, ed essere in grado di rivelare la presenza di contaminanti in concentrazioni dell'ordine dei ppm (parti per milioni) [46].

I metodi per l'identificazione degli allergeni possono avere come *target* (bersaglio) la proteina allergenica stessa, o possono essere direzionati per rivelare un marcatore allergenico equivalente, come i frammenti peptidici o le sequenze geniche, che generalmente indicano la presenza della proteina [9], [46].

I principali metodi usati per il rivelamento di allergeni in matrici alimentari sono metodi immunologici, metodi basati sulla spettrometria di massa ed l'amplificazione del genoma.

I risultati che si ottengono dall'applicazioni di metodi analitici possono essere qualitativi o quantitativi/semi quantitativi a seconda della tecnica usata.

I metodi immunologici (ELISA) hanno come *target* le proteine allergeniche e sono basati sull'uso di anticorpi specifici.

L'acronimo ELISA sta per *Enzyme-linked immunosorbent assays* ed è la tecnica comunemente usata come metodo di *routine* per la rivelazione degli allergeni presenti negli alimenti da parte dell'industria alimentare, grazie alla sua rapidità di risposta, affidabilità, non richiede strumenti speciali per l'analisi multi determinativa (in simultaneo) degli allergeni ed è *user-friendly*.

L'ELISA è una tecnica quantitativa che rivela la presenza di allergeni o delle proteine *marker* specifiche (antigeni) grazie alla formazione di un complesso con uno anticorpo specifico. La concentrazione del complesso è misurata tramite assorbanza di prodotto colorato

I test ELISA sono disponibili in forma di kit commerciali e possono essere competitivo (rivelazione indiretta) od in sandwich (rivelazione diretta), essendo quest'ultimo più usato nell'industria alimentare. L'impiego di questi kit presenta però dei problemi che sono: la difficile estraibilità degli allergeni (inibizione dell'estrazione da parte dei componenti della matrice) e cross-reattività con altre specie non allergeniche generando dei falsi positivi [46], [51].

La spettrometria di massa viene usata nell'identificazione di proteine allergeniche come tecnica singola, ma può anche essere usata accoppiata alla cromatografia liquida (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) in modo da sfruttare il suo elevato potere identificativo in modo da abbinare con l'alto potere separativo che caratterizzano le tecniche cromatografiche.

Le tecniche basate sull'analisi delle proteine devono tenere in considerazione [52]:

- L'abbondanza della proteina allergenica nell'alimento
- La facilità di estrazione della proteina dalla matrice alimentare
- La digestione della proteina allergenica deve essere riproducibile e completa

- La proteina allergenica deve essere resistente alle modificazioni che subisce durante i processi di trasformazione dell'alimento

Sebbene le tecniche immunologiche siano più specifiche per l'identificazione delle proteine allergeniche, le tecniche basate sul DNA sono più adatte per matrici alimentari molto complesse o nel caso di alimenti che hanno subito numerosi processi di trasformazione. Le tecniche immunologiche sono più indicate per l'analisi di alimenti crudi o che hanno subito blandi processi, laddove la proteina possiede ancora la sua integrità strutturale [46].

## 9. Metodi di biologia molecolare usati nel rivelamento degli allergeni alimentari

### 9.1 DNA come marcatore molecolare

Le tecniche che usano il DNA come marcatore nell'identificazione di allergeni alimentari sono tecniche indirette perché non individuano direttamente la proteina allergenica, ma piuttosto identificano una sequenza di DNA che codifica una determinata proteina allergica presente nella matrice alimentare [53].

Il DNA è una molecola che resiste a temperature elevate (fino a 100 °C), quindi resiste alla cottura (molte noci vengono tostate in forno), le proteine invece, si denaturano a temperature più basse (intorno a 60 °C).

Un altro vantaggio nell'uso di tecniche basate sull'identificazione del DNA presente in una matrice alimentare, è dovuto al fatto che non tutte le proteine allergeniche sono state identificate, e quindi non esistono kit ELISA per identificare tutte gli allergeni [46].

Le tecniche di biologia molecolare normalmente si basano sull'amplificazione specifica di frammenti di DNA dell'allergene mediante PCR (Reazione a Catena della Polimerasi). Con la tecnica PCR *end-point* si ottiene un risultato qualitativo, ossia si riesce ad identificare l'eventuale presenza della componente allergenica del cibo. La tecnica PCR è molto utilizzata in campo alimentare grazie alla sua elevata sensibilità. Si può usare per l'analisi di matrici alimentari dove il DNA è presente anche in scarsa quantità (tracce) grazie al fatto che la reazione può iniziare a partire da una sola molecola che servirà poi da stampo durante l'amplificazione. Con la tecnica *Real-time* PCR invece, si ottiene un risultato quantitativo, ovvero, si riesce a conoscere la precisa quantità di DNA della componente allergenica [53].

Trattandosi di analisi indirette, si possono ottenere informazioni sulla presenza o assenza di un ingrediente allergenico che è presente nell'alimento, tuttavia le analisi non individuano necessariamente la presenza della proteina allergenica stessa. Utilizzando insieme la PCR *end-point* e la *Real-time* PCR si riesce a rivelare la presenza dell'allergene e a quantificarlo, anche quando è presente in piccole quantità (<10 ppm) [53].

L'analisi per il rivelamento del DNA in matrici alimentari comprende tre fasi:

- 1) estrazione e purificazione del DNA;
- 2) amplificazione della (e) sequenza (e) di DNA target;
- 3) rivelamento dei frammenti di DNA che si sono amplificati in 2).

### Effetto della Matrice Alimentare

La matrice alimentare può interferire negativamente sull'estrazione del DNA dell'allergene. La tecnica scelta per l'estrazione del DNA deve garantire che il DNA estratto abbia un'elevata qualità e che sia presente in buona concentrazione. Quindi, il metodo d'estrazione deve garantire che il DNA estratto sia privo di contaminanti, quali, enzimi, RNA, od altri componenti della matrice (polisaccaridi, polifenoli, proteine). Nel caso in cui ci siano contaminanti, questi potrebbero avere una funzione inibitoria nelle successive fasi della reazione di PCR [53].

### Struttura del DNA

La struttura del DNA fu descritta nel 1953 dagli scienziati James D. Watson e Francis Crick. Il DNA è una macromolecola composta da due filamenti antiparalleli che formano una doppia elica grazie alla presenza di legami idrogeni. Ciascun filamento è costituito da monomeri che sono chiamati nucleotidi. I nucleotidi che formano il DNA sono quattro: A-adenina, T-timina, C-citosina, G-guanina). Ogni base nucleotidica è composta da tre elementi: uno zucchero (desossiribosio), un gruppo fosfato ed una base azotata. Due nucleotidi sono legate tra di loro tramite legami

fosfodiesterici che si stabiliscono tra l'ossidrilico al 3' di un nucleotide e il gruppo fosfato al 5' del nucleotide successivo [54]. I legami idrogeni che si stabiliscono per formare la doppia elica collegano le basi azotate che sono posizionate internamente rispetto allo scheletro esterno formato dai residui di desossiribosio e fosfato. L'appaiamento tra le basi è specifico, di conseguenza si formano due legami idrogeno tra l'adenina e la timina, e tre legami idrogeno tra la citosina e la guanina (Figura 9).

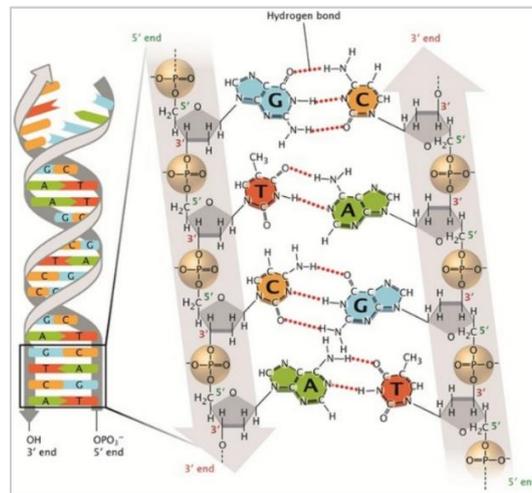


Figura 9 - Struttura schematica della molecola di DNA. A destra si illustra la doppia elica. A sinistra sono rappresentati i nucleotidi che costituiscono la molecola. Le basi sono collegate tra di loro da 2 o 3 legami idrogeno [55].

## 9.2 PCR: reazioni a catena della polimerasi

La tecnica PCR fu inventata da Kary Mullis nel 1983, e si basa sull'amplificazione selettiva *in vitro* di una sequenza target di DNA con l'utilizzo di corte sequenze specifiche di nucleotidi (*primers*). La reazione di amplificazione viene catalizzata dalla DNA polimerasi e viene ripetuta per un certo numero di cicli (30-40). Assumendo un'efficienza della reazione del 100 %, alla fine di 30 cicli, da una coppia di DNA bersaglio ci saranno  $2^{30}$  coppie [56].

### PCR end-point

I reagenti fondamentali della reazione di PCR sono: la molecola di DNA a doppio filamento che serve come stampo nell'amplificazione, due *primers* che riconoscono il frammento d'interesse e si legano al DNA stampo, la *Taq* polimerasi che sintetizza la nuova molecola di DNA aggiungendo i nucleotidi (dNTPs: A-adenina, T-timina, C-citosina, G-guanina) complementari al filamento singolo di DNA. Vengono aggiunti alla miscela anche degli elementi di supporto dell'attività della DNA polimerasi come il magnesio (esempio:  $MgCl_2$ ) [56].

Innalzando la temperatura della reazione si riesce a separare la molecola di DNA a doppia elica in due singoli filamenti (fase di denaturazione). Questo passaggio consente l'ibridazione dei *primers*, anch'essi presenti come filamento singolo. I *primers*, corti frammenti (15-30 nucleotidi) complementari alla sequenza di DNA che si vuole amplificare, sono altamente specifici e, quindi, solamente i frammenti di DNA di interesse sono amplificati. La *Taq* polimerasi è un enzima termostabile (estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*). I *primers* nella reazione PCR fungono da innesco alla *Taq* polimerasi, che si lega ed inizia la replicazione.

La reazione di PCR comprende tre fasi: **denaturazione**, **annealing** (ibridazione dei *primers*) ed **estensione**. In Figura 10 è riportato lo schema della reazione di PCR.

La **denaturazione** comporta il riscaldamento della miscela di reazione a 94 °C. A questa temperatura, i legami idrogeno, che tenevano assieme i due filamenti della molecola di DNA, si rompono perciò il DNA, da doppia elica, viene denaturato a due filamenti singoli. Questi filamenti singoli fungono entrambi da stampo nella fase successiva.

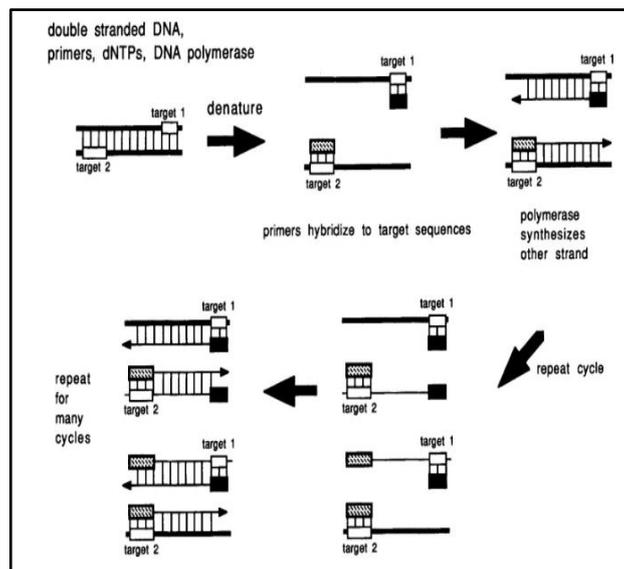


Figura 10- Fasi di amplificazione di una sequenza target di DNA tramite PCR.

Abbassando la temperatura a circa 55-65 °C, entrambi i *primers*, *forward e reverse*, si ibridizzano con i filamenti singoli complementari di DNA stampo (fase di **annealing**). La temperatura di **annealing** è specifica per ogni coppia di *primers* utilizzata ed è calcolata con la seguente formula che tiene conto della temperatura di denaturazione (melting,  $T_m$ ) dei *primers* stessi:

$$T_m = (4 \times [G + C]) + (2 \times [A + T])$$

La  $T_{annealing}$  ottimale è 1-2 °C inferiore alla  $T_m$  e permette ai *primers* di legarsi correttamente e in maniera stabile ai filamenti di DNA.

La *Taq* polimerasi incorpora i deossinucleotidi (dNTPs) nella direzione 5'-3' e sintetizza il filamento di DNA singolo complementare allo stampo. Questa rappresenta la fase di **estensione** e la temperatura ottimale è pari a 74 °C.

La temperatura viene nuovamente aumentata a 94 °C per iniziare un nuovo ciclo di amplificazione. La reazione di PCR viene ripetuta generalmente per altri 30 cicli (procedura standard), il che comporta un'amplificazione esponenziale della sequenza *target* di DNA. Alla fine della reazione di PCR si ottengono milioni di coppie della sequenza d'interesse. Quando la reazione è finita, i prodotti dell'amplificazione (detti ampliconi) possono essere visualizzati attraverso una corsa elettroforetica in gel di agarosio. In tal modo è possibile verificare l'avvenuta amplificazione del frammento di DNA di interesse.

## Real-time PCR

La tecnica *Real-time* PCR è simile alla PCR *end-point*, con la differenza che i prodotti della reazione della DNA polimerasi sono misurati in tempo reale nel primo caso, mentre nella PCR *end-point* i prodotti sono misurati solamente alla fine della reazione. Questo fa sì che la *Real-time* PCR sia una tecnica molto più sensibile dato che riesce a quantificare le sequenze target di DNA man mano che si formano. La quantificazione è possibile grazie alla presenza di materiali di riferimento, o standard, che serve per costruire la curva di calibrazione. Anche così non è sempre facile convertire la determinazione basata sul numero di copie di una sequenza di DNA in una quantità in peso. La quantificazione è basata sul numero di copie derivanti dai valori dei cicli soglia, detti Ct [57].

Il rilevamento dei prodotti amplificati avviene tramite misurazione della fluorescenza che viene registrata in ogni ciclo di amplificazione. La fluorescenza è proporzionale alla quantità di DNA presente ed il risultato è una curva utile per quantificare la quantità iniziale di DNA bersaglio presente nel campione in esame.

La molecola di DNA, di per sé, non presenta fluorescenza ma, tramite l'aggiunta nella reazione di PCR di elementi dotati di proprietà fluorescenti, il complesso che si forma è fluorescente. La fluorescenza è proporzionale alla concentrazione di DNA bersaglio presente all'inizio della reazione

di PCR. Il risultato della misura della fluorescenza rispetto alla concentrazione di DNA è una curva come quella rappresentata nella Figura 11:

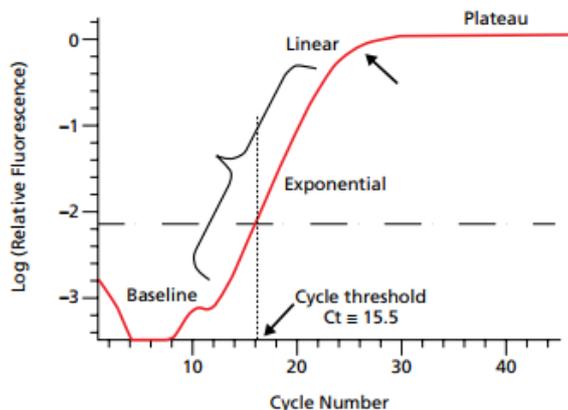


Figura 11- Curva dell'amplificazione di una sequenza target di DNA tramite Real-time PCR. Il grafico è suddiviso in tre regioni che mostrano le fasi dell'amplificazione PCR: segnale di fondo (*baseline*), fase esponenziale (*exponential*) ed una fase di *plateau*. Nei primi cicli di amplificazione il segnale di fluorescenza è minima; dopo i primi cicli, la fluorescenza supera il livello soglia (linea tratteggiata) ed aumenta in maniera esponenziale. Nella fase *plateau* il segnale di fluorescenza rimane costante, probabilmente perché la reazione PCR raggiunge un'inibizione del prodotto, od i reagenti sono limitati. La fase esponenziale è caratterizzata da un aumento significativo del segnale di fluorescenza e l'andamento della curva è lineare. Nel grafico è anche evidenziato il ciclo soglia, Ct. Il Ct è un punto di intercezione tra la il livello soglia e la curva di amplificazione.

Per rendere fluorescenti i prodotti della reazione di amplificazione, in modo da poterli quantificare, si possono usare diverse strategie (Figura 12): l'uso di coloranti fluorescenti (bromuro di etidio, SYBR Green I) che, legandosi alle molecole di DNA a doppio filamento ne incrementano la fluorescenza, oppure l'uso di sonde fluorescenti specifiche (ad esempio le sonde *Taqman*).

Il SYBR Green I è una molecola con formula molecolare  $C_{32}H_{37}N_4S$  che appartiene alla classe delle cianine asimmetriche e dotata di intrinseca attività fluorofora. Il SYBR Green I è una molecola fluorescente aspecifica che si lega con grande affinità alla molecola di DNA in doppio filamento, incrementando la sua capacità fluorescente oltre 1000 volte [58].

Le sonde (*probes*) fluorescenti sono corti oligonucleotidi che si legano in maniera specifica ad una sequenza complementare presente nella molecola di DNA a filamento singolo che è in corso di amplificazione. Queste sonde sono marcate con molecole fluorescenti presenti nella loro estremità 5' (fluoroforo detto *reporter-R*) o 3' (*quencher-Q*). In assenza di amplificazione, i due fluorofori sono vicini e non emettono fluorescenza. Durante la reazione di PCR, invece, le sonde sono idrolizzate determinando il rilascio del fluoroforo che può emettere fluorescenza [59]. Le sonde offrono maggior specificità perché il segnale di fluorescenza che viene misurato è quello relativo all'amplificazione della sequenza di DNA *target* [59].

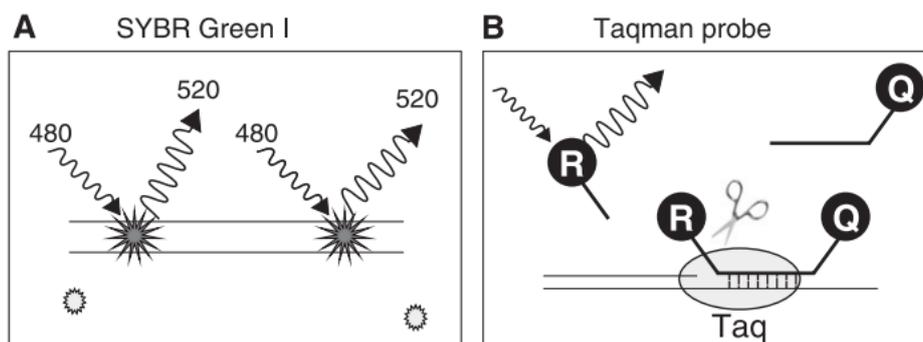


Figura 12 - Chimica della *Real-time* PCR. A- Il fluoroforo SYBR Green I assorbe la radiazione alla lunghezza d'onda di 480 nm ed emette la radiazione alla lunghezza d'onda di 520 nm quando si trova intercalato alla molecola di DNA doppio filamento; B- la sonda Taqman è composta da un fluoroforo ad alta energia (*reporter* –R) ed un inibitore del fluoroforo (*quencher* –Q). Quando il reporter ed il quencher si trovano vicini, ossia collegati alla sonda, non si registra nessuna fluorescenza. Nella fase di sintesi della nuova molecola di DNA, la DNA polimerasi (Taq) idrolizza la sonda, lasciando così liberando il *reporter* dal *quencher*. Il *reporter* allontanandosi dall'inibitore emette radiazione, e la sua fluorescenza viene misurata [59].

### 9.3 Quantificazione del DNA

Il DNA estratto dalla matrice alimentare viene analizzato prima di essere utilizzato nelle fasi successive per verificarne la qualità e quantità. I metodi spettrofotometrici di assorbanza UV-VIS sono comunemente utilizzati per la quantificazione e determinazione della purezza degli acidi nucleici. Con uno spettrofotometro si misura la quantità di radiazione assorbita da un campione nella regione dal vicino ultravioletto al vicino infrarosso (190-840 nm). Gli acidi nucleici hanno un'assorbanza massima a 260 nm (DNA e RNA), mentre le proteine assorbono la radiazione a 280 nm.

La concentrazione di DNA presente in una soluzione può essere ricavata dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon_{\lambda} * b * C$$

dove A è l'assorbanza,  $\epsilon_{\lambda}$  è il coefficiente di assorbimento molare che dipende dalla lunghezza d'onda, b è il cammino ottico della cuvetta e C la concentrazione.

Per determinare la concentrazione di DNA e la sua purezza, si misura l'assorbanza della soluzione in esame alla lunghezza d'onda di 260 nm e 280 nm. Il rapporto  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  può fornire una stima della purezza, ossia, l'indice della contaminazione da proteine. Un campione di DNA viene considerato "puro" se il rapporto  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  cade nell'intervallo tra 1.7-2.0.

Sebbene i metodi spettrofotometrici siano usati comunemente per determinare la concentrazione degli acidi nucleici, tali metodi possono dare risultati non accurati se il campione da analizzare contiene

altre molecole contaminanti, come nucleotidi liberi e sali, che assorbono alla stessa lunghezza d'onda della molecola di DNA.

Inoltre, poiché i metodi spettrofotometrici non sono in grado di distinguere tra DNA a doppio e a singolo filamento e non distinguono nemmeno l'RNA e i nucleotidi liberi, che assorbono a 260 nm, per determinare la concentrazione del DNA in analisi biologiche vengono usati metodi basati sulla fluorescenza [60]. I metodi fluorimetrici usano fluorofori specifici capaci di intercalarsi nelle molecole di DNA a doppio filamento; questa interazione provoca un notevole aumento della loro fluorescenza (>1000 volte) [58] e per tale motivo sono ritenuti più sensibili e specifici dei metodi spettrofotometrici, specialmente se usati quando la concentrazione di DNA è bassa [61].

La fluorescenza che si genera quando i fluorofori si complessano con la molecola di DNA è rilevabile utilizzando un fluorimetro che misura la radiazione emessa da un campione a una data lunghezza d'onda, caratteristica del fluoroforo usato. L'intensità di fluorescenza è proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione.

Per calcolare la concentrazione del DNA presente in un campione bisogna avere a disposizione una curva di calibrazione che si ottiene dall'intensità di fluorescenza in funzione della concentrazione di campioni standard.

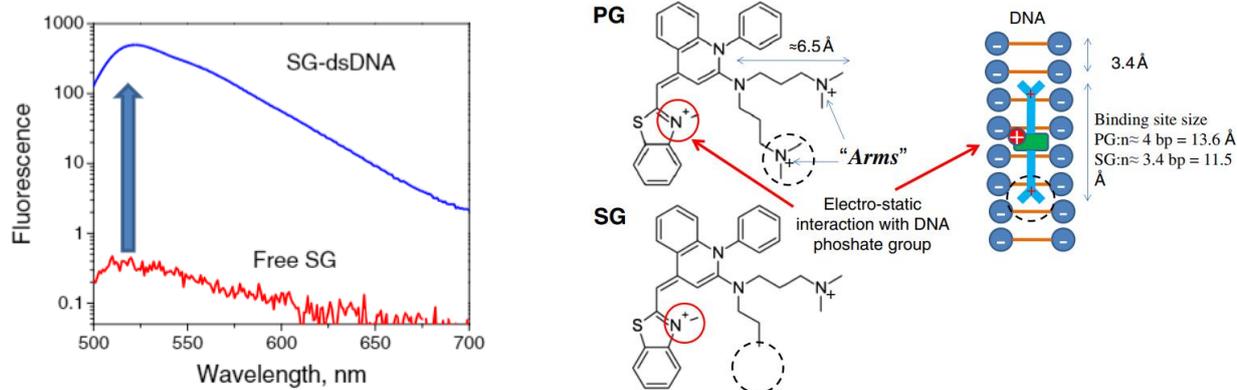


Figura 13- Rappresentazione della fluorescenza del fluoroforo SYBR Green I libero in soluzione e quando si trova intercalato ad una molecola di DNA a doppio filamento. Dal grafico si può vedere che la fluorescenza del Syber Green aumenta drasticamente quando si trova complessato ad una molecola di DNA a doppio filamento [61]. A destra viene rappresentata la struttura delle molecole fluorescenti PicoGreen e SYBR Green proposte da Dragan *et al.*: a sinistra ci sono le strutture del PicoGreen e il SYBR ove sono evidenziate tre elementi strutturali responsabili delle interazioni con la molecola del DNA; a destra viene proposto un modello del complesso SYBR/DNA.

## 10. Identificazione di specie

L'identificazione di specie di interesse è importante per conoscere con certezza la purezza di un prodotto e verificare la composizione della matrice processata.

L'applicazione delle metodiche molecolari risulta un mezzo ottimale per verificare la presenza di specie allergeniche lungo la filiera alimentare fornendo risultati rapidi ed affidabili.

### 10.1 DNA Barcoding

L'idea di creare un codice per identificare un prodotto presente in un supermercato e di riuscire a leggerlo usando un lettore ottico in maniera automatica del fu sviluppata da Norman Joseph Woodland e Bernard Silver nel 1948, allora studenti di Ingegneria dell'Università di Drexel.

Secondo Hebert et al., l'identificazione di specie basata sui caratteri morfologici dimostra essere insufficiente per riuscire a conoscere tutte le specie che popolano il Pianeta che si pensa essere di 10-15 milioni. Nel 2003, un nuovo sistema di identificazione delle specie è stato sviluppato da parte dei ricercatori dell'Università di Guelph (Canada), al quale hanno chiamato di DNA Barcoding - codice a barre del DNA [62].

Questo approccio si basa sull'identificazione delle specie mediante una breve sequenza universale del DNA dimostra essere efficace per l'identificazione delle diverse specie in quanto supera i limiti della discriminazione basata su descrittori fenologici quali l'influenza di fattori esterni che possono alterare il fenotipo e i lunghi tempi necessari per i rilievi [63].

Questa tecnica richiede due caratteristiche fondamentali per potere essere applicata: elevata copertura tassonomica e alta risoluzione. L'elevata copertura tassonomica si riferisce alla corretta amplificazione della regione genica scelta come codice a barre del DNA (*barcode*) nel pannello più ampio di tassa [62].

Mentre molti studi sul codice a barre del DNA negli animali hanno raggiunto alti tassi di discriminazione delle specie usando una singola regione, il citocromo-c ossidasi subunità I, COI. Per le piante invece l'uso di questa regione genica si è rivelato necessario una sfida purché i geni mitocondriali nelle piante presentano poca variabilità. Per superare questo problema è stato necessario utilizzare una combinazione di regioni per ottenere un sufficiente successo di discriminazione. Le regioni scelte come sequenze *barcode* nelle piante appartengono alle regioni

geniche provenienti da plasmidi, e sono: due regioni del cloroplasto, *matK* e *rbcL*, una regione spaziatrice come il *trnH-psbA*, e i marcatori nucleari ITS ed ITS2 [63].

Il vantaggio principale del DNA *Barcoding* è che una volta stabilito un solido *database* di riferimento, il metodo non richiede conoscenze tassonomiche esperte per identificare campioni specifici. Una volta amplificata e sequenziata, la sequenza è confrontabile con tutte le sequenze disponibili e catalogate negli anni. Il BOLD (Barcode of Life Database) ed il National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) sono le due piattaforme sui quali si basa la tecnica del DNA *Barcoding* per analisi delle sequenze.

La tecnica del DNA *Barcoding* viene usata con successo nell'identificazione di specie ittiche, di prodotti derivati del latte e piante come la salvia e l'origano. Tuttavia questa tecnica dimostra avere dei problemi quando applicata nell'identificazione di specie in alimenti processati a causa della possibile alterazione della struttura del DNA. Inoltre, le matrici alimentari sono costituiti da varie ingredienti appartenenti a diverse specie che possono interferire nell'identificazione del DNA della specie bersaglio [63].

Tuttavia, secondo [63], la tecnica del DNA *Barcoding* presenta due vantaggi quando usato nell'identificazione di specie in alimenti processati:

1. richiede l'amplificazione di un breve frammento di DNA (quindi c'è un minor rischio che il DNA sia frammentato)
2. si basa sul genoma mitocondriale o plastidiale (più conservato durante in lavorazione)

## 10.2 Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento è il processo di determinazione dell'ordine dei nucleotidi (Adenina, Citosina, Guanina e Timina) in un frammento di DNA.

### Metodo Sanger

Nel metodo sviluppato da Fred Sanger, il DNA bersaglio viene copiato varie volte mediante PCR, producendo frammenti di lunghezze diverse. I nucleotidi (dideossitri-fosfato, ddNTPs o "terminatori a catena" fluorescenti) segnano le estremità dei frammenti e consentono di determinare la sequenza.

I nucleotidi dideossitri-fosfato sono simili ai nucleotidi comuni, ma con una differenza fondamentale: manca un gruppo idrossile nella posizione 3 'del carbonio dell'anello di saccarosio. In un nucleotide

comune, il gruppo idrossilico 3' agisce come un "gancio", consentendo di aggiungere un nuovo nucleotide alla catena esistente.

Una volta aggiunto un dideossitriofosfato alla catena da parte della DNA polimerasi durante la sintesi della catena complementare, la polimerasi si blocca perché se non c'è il gruppo idrossile disponibile non è possibile aggiungere altri nucleotidi. La catena termina con il dideossitriofosfato, che è contrassegnato con un particolare colore a seconda della base (A, T, C o G) che trasporta.

## Next Generation Sequencing (NGS)

L' NGS è anche chiamata "high-throughput sequencing" (sequenziamento ad alta resa) a causa di un drastico aumento nella capacità di sequenziamento dei nucleotidi grazie alle nuove tecnologie di ultima generazione che hanno permesso di ridurre i costi ed i tempi di sequenziamento, leggendo le sequenze in parallelo di singoli geni, esomi ed intero genoma. Per sequenziare il DNA con un strumento di nuova generazione, prima si deve creare una *library* (libreria) di frammenti di DNA, dove all'estremità di ciascun frammento viene legato covalentemente delle sequenze di "DNA sintetico" chiamati *adapters* (adattatori), da parte di una DNA ligasi. Gli *adapters* sono sequenze standard specifiche per ogni piattaforma NGS. Quando il sequenziamento viene usato con la tecnica del DNA Barcoding uno degli *adapter* viene sostituito da un *barcode* (sequenze brevi del DNA che vengono utilizzati nel sequenziamento in *multiplex*). La *library* viene successivamente amplificata (ad opera della DNA polimerasi) per generare tante copie del frammento di DNA che si vuole sapere la sequenza. Le sequenze generate sono chiamate *reads*. Un algoritmo raccoglie poi tutte le sequenze delle reads ottenute e le allinea con le sequenze di riferimento (*reference sequence*) presenti nei *database* fino ad ottenere la sequenza di interesse.

## Piattaforma NGS Ion Torrent

Il concetto su cui basa il sistema Ion Torrent è quello di eseguire il sequenziamento per sintesi, con rilevazione elettrochimica della sintesi. Ciascuna delle reazioni elettrochimiche sviluppate è accoppiata al proprio sensore, che sono a loro volta organizzate in un *array* di sensori parallelamente massiccio su un chip CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) che è in grado di monitorare le variazioni del pH ambientale dovuto al formarsi di ioni quando un singolo nucleotide (dNTP) è incorporato dall'enzima DNA polimerasi nella catena nascente di DNA a doppio filamento. Quando il dNTP aggiunto è incorporato dalla polimerasi nella sintesi del filamento del DNA complementare, uno ione idrogeno ( $H^+$ ) viene rilasciato e questo viene rilevato dal sensore CMOS.

L'aggiunta successiva dei nucleotidi è detta "chiamata delle basi". Quando l'ione è rilasciato comporta una variazione di pH (delta pH) che viene successivamente convertito in un accumulo di carica positiva e misurato da un sensore all'interno dello strumento. Il segnale generato viene inviato ad un computer per l'elaborazione [64].

Per effettuare un sequenziamento con il sistema Ion Torrent, il DNA stampo viene amplificato tramite PCR in emulsione. Successivamente vengono inseriti i singoli nucleotidi da parte della DNA polimerasi. L'innovazione di questa tecnologia di sequenziamento del DNA è l'eliminazione sia della scansione ottica che la necessità del dNTP collegato ai fluorofori. L'aggiunta di un singolo nucleotide si verifica uno alla volta, quindi non è necessario bloccare i dNTP, come nel caso del sequenziamento attraverso il metodo Sanger.

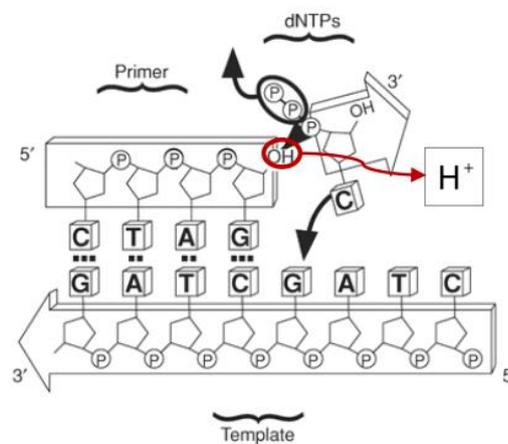


Figura 14 – meccanismo della "chiamata delle basi".

## 11. Analisi fingerprinting dei composti volatili negli alimenti

Molto spesso, la conformità sensoriale è valutata da pannelli interni. Tuttavia, i costi per l'addestramento del panel e la variabilità legata allo stato di salute, affaticamento, soggettività e differenze di sensibilità tra i valutatori, rendono la valutazione complicata e poco attendibile. Risulta necessario, a volte, cercare ulteriori metodi strumentali da affiancare a queste complesse valutazioni. I composti organici volatili (*Volatile Organic Compounds*- VOC) sono probabilmente i più importanti della vasta gamma di componenti alimentari, perché danno origine all'aroma e sono, quindi, fondamentali per rendere il cibo piacevole da mangiare.

I composti volatili sono definiti (articolo 268 del D. Lgs 152/2006) come “qualsiasi composto organico che abbia a 293,15 K una pressione di vapore di 0,01 kPa o superiore, oppure che abbia una volatilità corrispondente in condizioni particolari di uso” [65].

La qualità dei prodotti è fortemente correlata alle sue caratteristiche sensoriali: deve soddisfare requisiti definiti in termini di aspetto visivo, gusto e sapore, che sono attributi critici di qualità.

Grazie ai miglioramenti delle tecniche analitiche, che hanno aperto le porte all'area dei composti volatili alimentari, si stanno compiendo grandi progressi nella comprensione della funzione dei VOC negli alimenti. L'attuale attività, sia nella ricerca che nell'industria, è focalizzata in tre aree principali: tracciare il profilo dell'aroma, controllare la sicurezza alimentare e verificare la qualità degli alimenti [66].

### 11.1 VOC's nella frutta a guscio

La frutta a guscio subisce processi di irrancidimento poco dopo la raccolta, durante lo stoccaggio e nei processi di lavorazione. Questo succede a causa dell'elevata concentrazione di acidi grassi insaturi che costituiscono i lipidi presenti nella frutta a guscio. Gli acidi grassi sono accumulati all'interno di particelle subcellulari, dette oleosomi o sferosomi, dove sono protetti dai fenomeni di irrancidimento ossidativo. Questi lipidi, una volta che vengono messi in contatto diretto con l'ossigeno atmosferico, possono subire processi di autossidazione accelerata dalla temperatura, dalla luce o dalla presenza di tracce di metalli, quali rame e ferro (presenti nei materiali di stoccaggio), che fungono da catalizzatori. Inoltre, i lipidi insaturi subiscono facilmente l'azione degli enzimi ossidativi, le lipossigenasi, che li degradano in idroperossidi instabili [67].

La decomposizione degli acidi grassi produce composti volatili e non volatili con conseguente formazione di gusto sgradevole e produzione di aromi rancidi. Questo comporta la perdita di qualità e di gradevolezza dei prodotti. Tuttavia, lo sviluppo di lievi processi di irrancidimento ossidativi è in parte necessario per la produzione dei composti volatili caratteristici dell'aroma delle noci naturali [37].

Nella Figura 15 sono schematizzate le reazioni di ossidazione che i lipidi insaturi subiscono dando origine ai composti volatili e non volatili caratteristici delle noci.

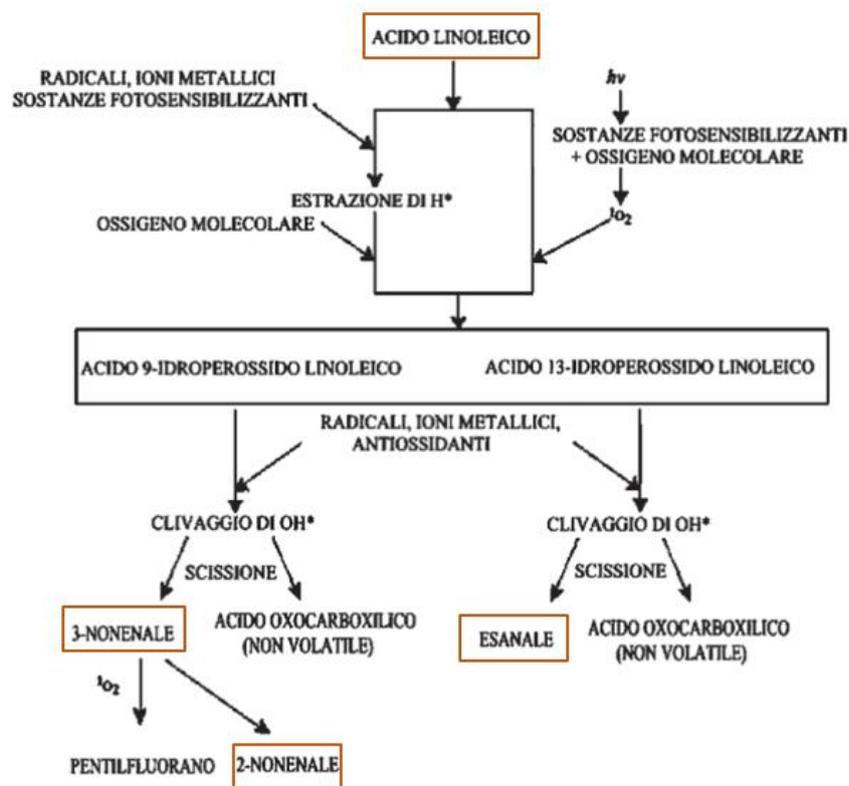


Figura 15 - Schema semplificato delle reazioni che si verificano durante l'ossidazione non enzimatica dell'acido linoleico con la generazione dei composti volatili e non volatili. Adattato da [67].

## 11.2 VOC's nella frutta a guscio dopo la tostatura

Molti noci vengono consumate non in forma naturale ma dopo tostatura. Questo trattamento termico in molti casi comporta un cambiamento nel gusto, nel colore e negli aromi originali. La tostatura delle noci catalizza la formazione di numerosi composti volatili attraverso tre vie principali [37]:

- 1) reazione di Maillard tra amminoacidi e zuccheri;
- 2) degradazione termica o caramellizzazione degli zuccheri;
- 3) degradazione lipidica, comprese le reazioni termiche (pirolisi) e ossidative.

Tutte queste reazioni svolgono un ruolo importante nello sviluppo di composti volatili caratteristici che costituiscono i profili aromatici dei vari tipi di noci tostate. La tostatura può, talvolta, essere deleteria perché cambia gli aromi ed il gusto delle noci. Molti fattori influenzano la produzione termica di sostanze volatili nelle noci. Ciò include la tipologia e la quantità di precursori dell'aroma (zuccheri, amminoacidi, contenuto lipidico, eccetera), oltre alla presenza di pro-ossidanti e antiossidanti, il contenuto di umidità e il pH. Inoltre, sono molto importanti anche le condizioni di tostatura, quali tempo e temperatura [37].

## 11.3 Nozione di Cromatografia

La cromatografia è una tecnica che, oltre a permettere la separazione di miscele complesse nei suoi vari componenti, ne consente anche la quantificazione.

Un sistema cromatografico è costituito da una fase stazionaria, una fase mobile e dai soluti che si vogliono separare. I soluti vengono veicolati lungo la fase stazionaria dal passaggio della fase mobile e la separazione avviene grazie alle diverse interazioni che si stabiliscono tra i soluti e le due fasi.

La fase mobile e la fase stazionaria possono essere di diversa natura. La fase stazionaria può essere solida o liquida, e la fase mobile è un liquido o un gas.

## 11.4 Gas-cromatografia e analisi dei composti volatili

La cromatografia gassosa è una tecnica usata in chimica analitica per analizzare e separare composti che possono essere vaporizzati senza subire un'eventuale decomposizione. Questa tecnica prevede la vaporizzazione della soluzione in analisi ed il successivo trasporto nella fase gas (fase mobile) attraverso una colonna dove è presente una fase stazionaria.

Si parla di cromatografia gas solido (*GSC*) quando la fase stazionaria è un solido granulare poroso, mentre si parla di cromatografia gas liquido (*GLC*), o di ripartizione, se la fase stazionaria è un liquido.

La fase stazionaria nella *GLC* è un liquido adsorbito, o legato chimicamente, ad un supporto inerte. I componenti del campione che viene iniettato in colonna si distribuiscono tra la fase stazionaria liquida e la fase mobile gassosa.

Quando si tratta di una *GSC*, i componenti del campione iniettato vengono adsorbiti sul solido (fase stazionaria) e il principio di separazione si basa sul fatto che i diversi componenti possono essere assorbiti più o meno fortemente dall'adsorbente. I materiali adsorbenti generalmente utilizzati in *GSC* sono gel di silice, carbone attivo, ossido di alluminio o i setacci molecolari.

Le forze che permettono la migrazione del soluto sono dovute al movimento del gas carrier, mentre le forze che tendono a trattenere il soluto sono date dall'affinità per la fase stazionaria. La combinazione di queste due forze produce la separazione. In questo modo le specie che possiedono maggiore affinità per la fase mobile vengono trasportate più lontano, a parità di tempo, rispetto a quelle che invece possiedono una maggiore affinità per la fase stazionaria.

I soluti vengono separati per eluizione e rivelati quando emergono dal gas alla fine della colonna. I diversi componenti di una miscela si distinguono in base al differente tempo che impiegano per passare attraverso la colonna, detto tempo di ritenzione. Il risultato di una corsa cromatografica è, quindi, un cromatogramma rappresentato da una serie di picchi che corrispondono ai diversi soluti separati dalla colonna in funzione del tempo di ritenzione.

## 11.5 Fast-GC: HERACLES II

La *FAST-GC*, come indica il nome, è una gascromatografia veloce in grado di ridurre i tempi di analisi rispetto ai tempi dell'analisi *GC* tradizionale.

Con la *FAST-GC*, pur effettuando analisi in tempi breve, è possibile mantenere una risoluzione sufficiente per la separazione di miscele di media e medio-alta complessità. In questo modo è possibile incrementare il numero di analisi eseguite, diminuendo i costi analitici, usando colonne più economiche e risparmiando tempo.

HERACLES II (Alpha M.O.S., Toulouse, France) è un naso elettronico di ultima generazione basato sulla tecnica di gascromatografia a doppio flash dedicata all'analisi del gusto e dell'aroma. I

cromatogrammi possono essere elaborati come un'impronta digitale del prodotto che permette di confrontare facilmente il profilo aromatico complessivo di un lotto con la qualità *target* richiesta.

Lo strumento è costituito da due colonne capillari di acciaio (colonna standard: lunghezza: 10 m; diametro interno 180  $\mu\text{m}$ ) con diversa polarità, disposte in parallelo, ed accoppiate a due rivelatori a ionizzazione di fiamma (*Flame Ionization Detectors* – FID); consente sia di misurare lo spazio di testa, sia di utilizzare la modalità di iniezione del liquido.

Poiché lo strumento contiene due colonne, si ottengono contemporaneamente due cromatogrammi, e questo consente una doppia identificazione dei composti chimici. È presente una trappola adsorbente solida termoregolata con effetto Peltier (0-260 °C) che consente un'efficace pre-concentrazione delle sostanze volatili leggere e mostra una grande sensibilità (fino a 1 ppb di benzene). Poiché la velocità di riscaldamento della colonna è elevata (fino a 10° C/secondo), i risultati sono disponibili in pochi secondi e il tempo del ciclo di analisi è di circa 5-8 minuti. I tempi di acquisizione da parte dello strumento sono molto rapidi: si possono addirittura ottenere 100 acquisizioni al secondo [66]. Nella Figura 16 è rappresentato il gascromatografo HERACLES II presente nel laboratorio di Chimica di COOP ITALIA.

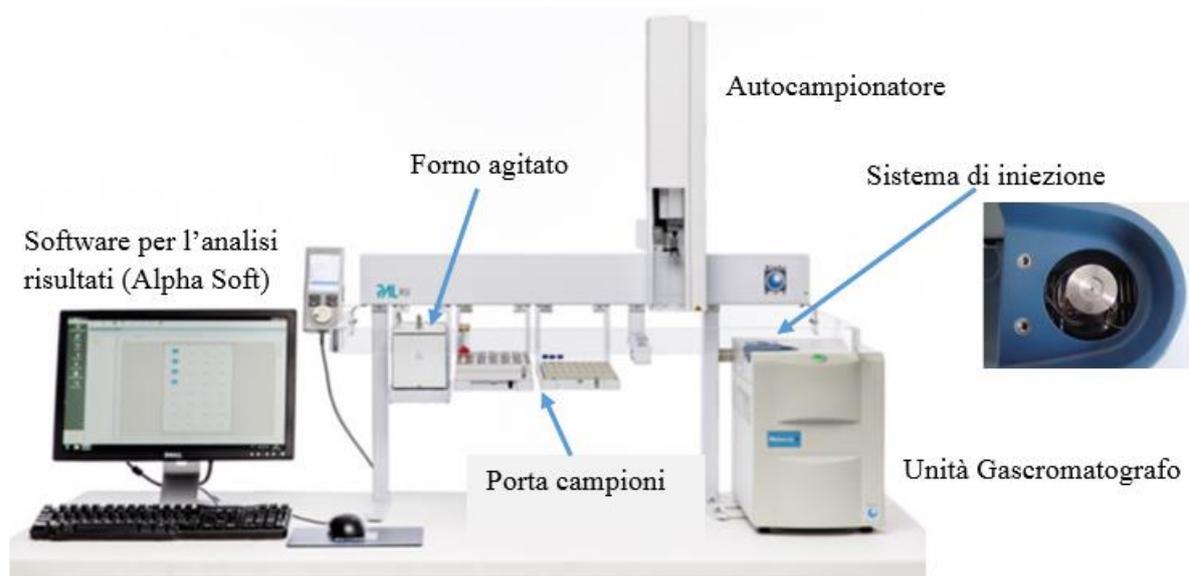


Figura 16 – Il gascromatografo HERACLES II (Alpha MOS, Toulouse – France) dove ci sono evidenziati i componenti principali. Adattato da [68].

## Analisi dei dati

HERACLES II consente di creare modelli per confrontare i profili sensoriali, per valutare la conformità sensoriale o per valutare gli attributi sensoriali.

Il software *Alpha Soft V12.4*, incorporato nello strumento HERACLES II, ha l'obiettivo di acquisire e memorizzare i dati dei cromatogrammi e, in particolare, acquisire l'area dei picchi e i tempi di ritenzione in modo da creare delle *library (data-set)* di partenza alle quali verrà successivamente applicata l'analisi statistica multivariata.

I composti vengono rilevati utilizzando il rivelatore FID e il *software* è in grado di "etichettare" ogni singola molecola confrontando il suo indice di ritenzione con l'indice di Kovats, precedentemente salvato nel database dello strumento. L'indice di Kovats è una grandezza adimensionale che si ottiene iniettando periodicamente una miscela standard di alcani lineari, da n-esano a n-esadecano. Per ogni picco della miscela incognita, si può ricavare l'indice di Kovats partendo dal suo tempo di ritenzione, in base al numero di atomi di carbonio presenti. Gli standard sono scelti in modo tale che escano dalla colonna prima e dopo rispetto al composto incognito in esame. Il vantaggio di questa analisi consiste nel fatto che per un generico picco cromatografico è possibile ottenere un valore di indice di Kovats che dipenda esclusivamente dalla chimica dell'analita e non dalle condizioni strumentali. In tal modo è possibile assegnare ad ogni picco una sola molecola confrontando gli indici ottenuti con quelli del database. Può succedere, tuttavia, che due, o più, molecole diverse abbiano lo stesso indice di Kovats. A questo punto, si calcola l'indice di Kovats per un generico composto incognito con l'Equazione 1.

$$I = \frac{100 * [n + (N - n) * \log(t_{rr}(\text{incognito})) - \log(t_{rr}(n))]}{\log(t_{rr}(N)) - \log(t_{rr}(n))} \quad \text{Equazione 1}$$

Dove,

I - Indice di ritenzione di Kovats,

n - numero di atomi di carbonio nell'alcano più piccolo,

N - numero di atomi di carbonio nell'alcano più grande,

t'r - tempo di ritenzione registrato.

Come risultato di un'analisi usando HERACLES II, è possibile ottenere informazioni sulla composizione dei campioni in esame e sul profilo della loro frazione volatile. In questo modo, si ottengono informazioni complete sulla somiglianza di un dato campione con il campione di riferimento. Con il naso elettronico HERACLES II è possibile, inoltre, utilizzare centinaia di variabili per ottenere risultati affidabili.

In letteratura sono presenti alcuni lavori in cui è descritto l'uso di HERACLES II per verificare la qualità e la conformità di vari alimenti, come per esempio, l'olio di oliva (Melucci *et al.*, 2016), le

bevande alcoliche (Śliwińska *et al.*, 2016a and 2016b) e lo zafferano (lavoro di Tesi Pettinari V., COOP ITALIA, 2018). Sono, inoltre, presenti in letteratura altri lavori in cui sono state usate tecniche gascromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa per l'analisi dei VOC presenti nelle varie specie di noci.

## 12. Scopo della Tesi

L'autenticità degli alimenti si riferisce al fatto che l'alimento che il consumatore acquista deve corrispondere alla sua descrizione presente in etichetta. Il fatto che piccole quantità di allergeni possono scatenare delle reazioni allergiche gravi (IgE immune-mediated), riuscire a rivelare la presenza di questi allergene è diventata quasi una sfida per l'industria agroalimentare.

Varie tecniche analitiche basate sull'identificazione delle proteine allergeniche e più recentemente basate sull'analisi del DNA sono disponibili per assicurare che l'etichetta sia conforme e garantire così la tutela della salute dei consumatori allergici.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di sviluppare e validare una metodica per la rivelazione del DNA delle specie allergeniche vegetali presenti in matrici alimentari tramite la tecnica del DNA Barcoding, e la tecnica della Reazione a Catena della Polimerasi in tempo reale (*Real-time* PCR).

La scelta della tecnica del DNA Barcoding è perché si è voluto fare una analisi multideterminativa in diverse tipologie di matrici alimentari ricreare in laboratorio con prodotti che si trovano comunemente in commercio. Il DNA di varie matrici contaminate con specie allergeniche vegetali è stato estratto e mediante il sequenziamento nello Ion Torrent (Life Technologies™). La *Real-time* PCR viene comunemente usata per l'amplificazione del DNA perché è una tecnica accurata e robusta adatta all'analisi del DNA è molto frammentato a causa dei diversi processi di lavorazione che subiscono gli alimenti.

Si è cercato inoltre di fare un'analisi *fingerprinting* dei composti volatili responsabili per gli aromi nelle noci commestibili usando il gascromatografo ultraveloce HERACLES II (Alpha M.O.S), basato sulla gascromatografia ultraveloce.

Queste tecniche sono dimostrate veloci ed affidabili. Il fatto che si riesce ad analizzare varie specie allergeniche in simultaneo, questa metodica risulta non essere molto costosa e può sicuramente essere usata come metodo di screening nella rivelazione di possibili contaminanti allergenici in prodotti alimentari, rilevando la presenza o confermando l'assenza.

## 13. Materiali e Metodi

### 14.1 DNA Barcoding

#### Campioni di alimenti allergenici per le analisi

Le noci ed i semi commestibili usati in questo lavoro di tesi per il rilevamento delle specie allergeniche vegetali sono riportati nella Tabella 4. I campioni di noci analizzati ed il sesamo sono prodotti che si possono reperire comunemente in commercio; la soia invece è uno standard certificato acquisito dalla CREA.

Allergene	Nome Inglese	Famiglia	Genere	Specie	Stato di fornitura per l'analisi
<b>Anacardo</b>	<i>Cashew</i>	Anacardiaceae	Anacardium	<i>A. occidentale</i>	Sgusciati; tostati
<b>Arachide</b>	<i>Peanut</i>	Fabaceae	Arachis	<i>A. hypogaea</i>	Tostati e salati
<b>Mandorla</b>	<i>Almond</i>	Rosaceae	Prunus	<i>P. dulcis</i>	Naturale
<b>Noce comune</b>	<i>Walnut</i>	Juglandaceae	Juglans	<i>J. regia</i>	Sgusciati; naturale
<b>Noce brasiliana</b>	<i>Brazilian walnut</i>	Lecythidales	Bertholletia	<i>B. excelsa</i>	Sgusciati; naturale
<b>Noce di cocco</b>	<i>Coconut</i>	Arecaceae	<i>Cocos</i>	<i>C. nucifera</i>	Farina di cocco
<b>Noce di macadamia</b>	<i>Macadamia nut</i>	Proteaceae	Macadamia	<i>M. integrifolia</i>	Sgusciati; naturale
<b>Noce pecan</b>	<i>Pecan nut</i>	Juglandaceae	Carya	<i>C. illinoensis</i>	Sgusciati; naturale
<b>Pinolo</b>	<i>Pine seed</i>	Pinaceae	Pinus	<i>P. pinea</i>	Sgusciati; naturale
<b>Pistacchio</b>	<i>Pistachio</i>	Anacardiaceae	Pistacea	<i>P. vera</i>	Sgusciati; tostati
<b>Sesamo</b>	<i>Sesame</i>	Pedaliaceae	Sesamum	<i>S. indicum</i>	Tostati
<b>Soia</b>	<i>Soy</i>	Fabaceae	Glycine	<i>G. max</i>	Naturale

Tabella 4- I campioni di allergeni usati in questo lavoro di tesi per l'analisi. Come stato di fornitura naturale si intende che i campioni non hanno subito ulteriori processi di lavorazione oltre a quelli necessari per lo sgusciamento.

## Preparazione delle matrici alimentari (spiking)

In un lavoro precedente è stata applicata la tecnica del DNA *Barcoding* sui campioni di allergene puri. L'analisi portata avanti in questo lavoro di tesi ha come obiettivo verificare l'applicazione di questa tecnica su matrici alimentari. Questo perché si è voluto ricreare il caso reale, dove l'allergene è mescolato assieme ad altri ingredienti. Per fare ciò, è stato necessario preparare in laboratorio delle matrici alimentari appropriate. Inoltre, è stato scelto di analizzare campioni al naturale e/o che hanno subito processi di lavorazione, quali tostatura in forno, macinazione, eccetera.

I campioni sono stati preparati mediante la tecnica dello *spiking*: questa tecnica consiste nell'usare una matrice alla quale vengono aggiunte quantità note di analita da quantificare. Sono state utilizzate due matrici, una a base di farina tipo "00" e l'altra a base di cioccolato al latte, alle quali sono stati aggiunte quantità note di due allergeni: arachide e noce. Le composizioni finali sono riportate nella Tabella 5.

ID Campione	Matrice	Contaminazione con l'allergene arachide (mg)	Concentrazione (%)	Contaminazione con l'allergene noce (mg)	Concentrazione (%)
4	Farina (1g) ( <i>Triticum aestivum</i> )	100	0.100	---	---
5		10	0.010	---	---
6		2	0.002	---	---
7		50	0.050	50	0.050
8		10	0.010	90	0.090
9		90	0.090	10	0.010
10	Cioccolato al latte (1g)	50	0.050	50	0.05
11		10	0.010	90	0.090
12		90	0.090	10	0.010

Tabella 5- Lista delle matrici prodotte in laboratorio da usare per l'estrazione del DNA genomico, usate per la rivelazione delle specie allergeniche attraverso la tecnica del DNA *Barcoding*.

Oltre alle matrici riportate nella Tabella 5, sono state realizzate altre tre matrici, riportate in Tabella 6. Queste matrici contenevano diversi allergeni mescolati insieme e, quindi, si possono considerare esempi di matrici alimentari molto complesse. Come visibile in tabella, è stata preparata perfino una matrice contenente 11 allergeni insieme (chiamata "Tutto").

ID Campione	Composizione Matrice	
<b>Tutto</b>	11 allergeni	Anacardo, arachidi, mandorle, noce Brasiliana, noce di cocco, noce comune, noce pecan, noce di Macadamia, pinolo, pistacchio, semi di sesamo
<b>2 Mix</b>	5 allergeni	Noce di cocco, mandorle, noce comune, noce pecan, pistacchio.
<b>3 Mix</b>	6 allergeni	Anacardo, arachide, noce brasiliana, noce di macadamia, pinolo.

Tabella 6- Lista delle altre tre matrici complesse formate da soli allergeni prodotte in laboratorio dai quali sarà estratto il DNA genomico, usate per la rivelazione delle specie allergeniche attraverso la tecnica del DNA *Barcoding*.

## Estrazione e Purificazione del DNA genomico totale

L'estrazione del DNA genomico dai campioni in esame prevede la purificazione del materiale genetico da tutte le altre sostanze presenti nel campione. Infatti tali contaminanti potrebbero interferire nelle fasi successive della procedura di analisi. Le fasi dell'estrazione sono tre:

- 1- frammentazione della matrice e lisi cellulare per recuperare il DNA in soluzione;
- 2- denaturazione delle proteine;
- 3- separazione del DNA dalle proteine con rimozione di tutti i contaminanti.

Per l'estrazione/purificazione del DNA genomico totale dalle matrici create è stato usato il *kit* commerciale DNeasy® mericon® Food (Qiagen) adatto per eseguire l'estrazione di allergeni in maniera veloce e affidabile. Il kit commerciale, inoltre, è applicabile a matrici alimentari complesse quali alimenti processati che hanno subito diverse fasi di trasformazione (trattamenti termici, esposizione ad alta pressione, cambiamenti bruschi di pH, eccetera) che causano la degradazione del DNA a frammenti di 100-200 bp. L'utilizzo del kit minimizza, inoltre, l'effetto degli inibitori della PCR [69]. Il kit è composto da tutti i reagenti necessari (soluzioni *buffer*, proteinasi K) per l'estrazione e purificazione del DNA oltre ai materiali da utilizzare (*ependorf* 1.5 mL, colonnine *spin column*) (Figura 14). Il protocollo prevede l'uso dell'estrattore automatico Qiacube® (Figura 15).

Durante tutte le fasi di manipolazione dei campioni sono stati usati guanti sterili e sono state evitate al massimo le contaminazioni tra campioni differenti durante le fasi di pesata e macinazione (ad esempio pulendo spesso le mani, la postazione nel banco e la bilancia con alcol).

La procedura di estrazione prevede l'uso di cloroformio capace di denaturare le proteine, rimuovere i lipidi e facilitare la separazione delle fasi durante l'estrazione (fase acquosa: contiene il DNA deproteinizzato; fase organica: contiene le proteine).



Figura 17 – Reagenti e materiali che costituiscono il kit commerciale DNeasy® mericon® Food (Qiagen).

In questo lavoro di tesi è stato seguito il protocollo standard descritto nel kit, apportando due modifiche al protocollo originale che prevede l'utilizzo di 2 g di materiale di partenza:

1. l'estrazione è stata eseguita a partire da 1g di matrice
2. l'omogeneizzazione è durata per tutta la notte al posto dei 30 minuti indicati nel protocollo

**Omogeneizzazione e lisi** – I campioni (Tabella 4) sono stati preventivamente macinati in un *mixer* in modo ad ottenere una polvere fina, dopodiché sono state preparate le diverse tipologie di matrici (Tabella 5 e 6).

Un'aliquota di 1g di ciascuna matrice è stata pesata in un tubo *falcon* da 15 mL ed in seguito sono stati aggiunti 10 mL di soluzione tampone (*Food Lysis Buffer*) e 25  $\mu$ L di proteinasi K (per la degradazione delle proteine). La soluzione finale è stata miscelata per qualche secondo, fino ad ottenere una miscela completamente omogenea. I tubi *falcon* sono stati, quindi, posti in incubazione in stufa a 60 °C per tutta la notte. La mattina seguente i tubi, prelevati dalla stufa e lasciati raffreddare a temperatura ambiente, sono stati centrifugati per 5 minuti a 2500  $\times$ g.

**Estrazione/purificazione con estrattore automatico** – Da ciascuna *falcon* sono stati prelevati 700  $\mu$ L di surnatante, evitando di prelevare particelle solide, poi trasferiti in *epENDORF* da 2 mL. Sotto cappa sono stati aggiunti 500  $\mu$ L di cloroformio e la miscela è stata agitata vigorosamente per 15 secondi. In seguito a centrifugazione a 14000  $\times$ g per 15 minuti è stato ottenuto un surnatante limpido, e 350  $\mu$ L di tale fase sono stati prelevati e trasferiti in nuove *epENDORF* da 2 mL.

L'estrazione del DNA genomico da questi campioni è stata eseguita utilizzando l'estrattore automatico Qiacube® (Qiagen). La procedura d'estrazione è del tutto simile a quella manuale e prevede i seguenti passaggi: lisi, legame selettivo del DNA alle colonne di silice (QIAquick® *Spin Columns*), lavaggio ed eluizione.

L'estrattore automatico, descritto in Figura 18, presenta una serie di componenti quali centrifuga ed agitatore (*shaker*) che sono necessari per l'estrazione del DNA. Il sistema consente di trattare 12 campioni in parallelo e contiene, all'interno, tutti i tamponi necessari per l'estrazione (AW2, EB, PB). Le *eppendorf* contenenti 350  $\mu$ L di ciascun surnatante ottenuto dopo estrazione con cloroformio vengono caricate nello *shaker*. La separazione del DNA dagli altri contaminanti avviene mediante l'utilizzo di colonnine contenenti una membrana in grado di legare il DNA. Conclusa la procedura di estrazione, il DNA purificato viene conservato a 4 °C fino alla successiva quantificazione.



Figura 18- Vista interna dell'estrattore automatico Qiacube®. 1- coperchio centrifuga; 2- centrifuga; 3- *shaker*; 4- rack reagenti; 5- sensore punte; 6- apertura per *eppendorf*; 7- rack punte; 8- apertura per smaltimento punte; 9- braccio robotico.

## Quantificazione del DNA

Per determinare la concentrazione del DNA isolato dalle matrici alimentari è stato utilizzato il kit *Qubit dsDNA BR (Broad-Range) assay*® (Invitrogen) che utilizza fluorofori specifici per il DNA, minimizzando così gli effetti di eventuali contaminazione. La quantificazione fluorometrica è stata fatta usando il fluorimetro *Invitrogen Qubit*® 3.0 (*Life Technologies*) e misurando la fluorescenza a 635 nm. Il fluorimetro *Qubit*® 3.0 è uno strumento che misura la quantità di DNA, in modo estremamente accurato in meno di tre secondi per campione da una piccola quantità di campione (1–20  $\mu$ L) [70].

Tutte le soluzioni sono state preparate a temperatura ambiente e protette dalla luce. La *Working Solution (WS)* è stata preparata diluendo 1:200 il reagente *Qubit*® nel tampone *Qubit*®. Per eseguire

la misurazione della fluorescenza, sono stati utilizzati pochi  $\mu\text{L}$  di campione di DNA (generalmente 1 e 3  $\mu\text{L}$ ) in 200  $\mu\text{L}$  di *working solution* (Tabella 7):

	<b>Volume Working Solution Qubit (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volume DNA (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>Provetta 1</b>	197	3
<b>Provetta 2</b>	199	1
<b>Volume totale</b>	200	

Tabella 7 - Composizione delle provette per la quantificazione del DNA con il saggio Qubit.

Le provette sono state agitate vigorosamente per qualche secondo e lasciate in incubazione per 2 minuti a temperatura ambiente prima di essere analizzate. È stata, quindi, eseguita la lettura al fluorimetro Qubit®, caratterizzato dai seguenti filtri di eccitazione (430-495 nm, blu e 600-645 nm, rosso) e filtri di emissione (510-580 nm, verde e 665-720 nm, rosso).

Generalmente, per una buona quantità della reazione di PCR per il rilevamento di specie sono indicati valori che possono variare tra i 10 ed i 20 ng/ $\mu\text{L}$ .

## 14.2 Sequenziamento NGS con il sistema Ion Torrent

Una volta eseguita la quantificazione del DNA genomico estratto dai vari campioni (Tabella 5 e 6), per verificarne anche la qualità, e si è proceduto al sequenziamento NGS usando il sistema Ion Torrent (Life Technologies™).

Il sequenziamento del DNA genomico prevede tre fasi: la preparazione dei campioni da analizzare, il sequenziamento vero e proprio e l'elaborazione dei dati. La fase di preparazione dei campioni consiste nella creazione della *library*, ovvero l'insieme di frammenti di DNA genomico per il sequenziamento NGS utilizzando la piattaforma Ion Torrent.

Ion Torrent (Life Technologies)

Il kit commercial SGS™ *All Species ID Plant DNA Analyser* è compatibile con il sequenziatore di ultima generazione che è presente nel laboratorio di biologia della COOP Italia, il sistema Ion Torrent (Ion Personal Genome Machine™, PGM™, System) rappresentato nella Figura 19.



Figura 19 – Sistema Ion Torrent (Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System).

Il kit SGS™ *All Species ID Plant DNA Analyser* è stato scelto per fare l'analisi di rivelamento delle specie allergeniche vegetali perché è stato progettato per rivelare tutte le specie presenti in un campione alimentare (*analisi untargeted*) [71].

Lo scopo di usare il kit è stato quello di creare librerie di amplificati per il sequenziamento del DNA genomico estratto dalle matrici alimentari create usando il sistema Ion Torrent™.

Tutti i reagenti necessari per questa analisi sono stati forniti dal kit, di conseguenza non si conoscono le concentrazioni dei reagenti né le sequenze dei *primers* e dei *barcodes* perché coperti da brevetto. La Master Mix è un cocktail contenente la DNA polimerasi, con gli elementi di supporto per l'attività della polimerasi, e la miscela di nucleotidi (dNTPs). In seguito è descritto la procedura fornita dal kit.



Figura 20 – Kit usato in questo lavoro di tesi per generare le *library* degli ampliconi e sequenziare il DNA usando lo strumento Ion Torrent Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing (Life Technologies™) [72].

## Preparazione della *library*

Le *library* per il sequenziamento sono state preparate con il kit SGS™ *All Species ID Plant DNA Analyser (Library: Plant 4 e Plant 5)*, in modo da ottenere una miscela di frammenti legati a due adattatori (*adapters*), presenti alle estremità 5' e 3' di ciascun frammento di DNA. Gli *adapters* sono corte sequenze oligonucleotidiche sintetiche che vengono legate covalentemente ai frammenti mediante una DNA ligasi.

Le fasi della preparazione delle *library* sono le seguenti:

1. Aggiunta ai frammenti del DNA genomico degli adattatori e incorporazione di un *barcode* (codice a barre), cioè identificatori univoci che vengono poi utilizzati per la successiva identificazione del campione;
2. Amplificazione mediante PCR (*end-point* PCR) dei frammenti dotati di *barcode* e adattatori;
3. Visualizzazione dell'avvenuta amplificazione;
4. Unione di tutti i frammenti amplificati per ottenere le *library*;
5. Pulizia delle *library*;
6. Quantificazione.

La quantità di DNA richiesta per la creazione delle *library* è pari a 50 ng. Allo scopo di utilizzare 5 µL di DNA nella reazione di amplificazione, la concentrazione del DNA di ogni campione è stata diluita a 10 ng/µL. I due campioni riportati in Tabella 1, a differenza degli altri, sono stati diluiti perché non presentavano la concentrazione richiesta per l'analisi.

ID Campione	Concentrazione media (ng/µL)
Tutto	16.9
9	68.0

Tabella 8 - Valori di concentrazione del DNA di due campioni (Tutto e 9) (fluorimetro Qubit®).

Per le reazioni di amplificazione tramite *end-point* PCR sono stati utilizzati i reagenti descritti in Tabella 9. Sono state preparate due miscele di reagenti, uno per ogni *library* generata (chiamate *Plant 4* e *Plant 5*).

Reagente	Volume/ 1 reazione (µL)
Acqua	8.75
<i>Barcode Primer</i>	1.25
Master Mix	10
DNA campione	5
Volume totale	25

Tabella 9 – Reagenti usati nella reazione di amplificazione (kit SGS™ *All Species ID Plant DNA Analyser*).

Le amplificazioni dei frammenti di DNA di interesse sono state eseguite nel termociclatore Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™), nelle condizioni riportate in Tabella 3.

Programma termico <i>end-point</i> PCR	Fase	Temperatura (°C)	Tempo	N° di cicli (x)
	Denaturazione	95	5 min	1
	Amplificazione	95	30 sec	30
		52	30 sec	30
		72	30 min	30
Estensione finale	72	5 min	1	

Tabella 10 – Programma termico per l’amplificazione con il kit SGS™ *All Species ID Plant DNA Analyser*.

I prodotti dell’amplificazione *end-point* PCR sono stati visualizzati attraverso una corsa elettroforetica in gel di agarosio (E-Gel™ 2 %, Invitrogen) per verificare l’avvenuta amplificazione del frammento di DNA di interesse (Figura 3). Per la rivelazione è stato usato il dispositivo E-Gel™ *Power Snap Electrophoresis Device* (Invitrogen). La lunghezza degli ampliconi, cioè dei frammenti di DNA amplificati, è stata misurata utilizzando il marcatore QX DNA Size Marker 100 bp – 2.5 kb (QIAXcel® DNA Size Markers).

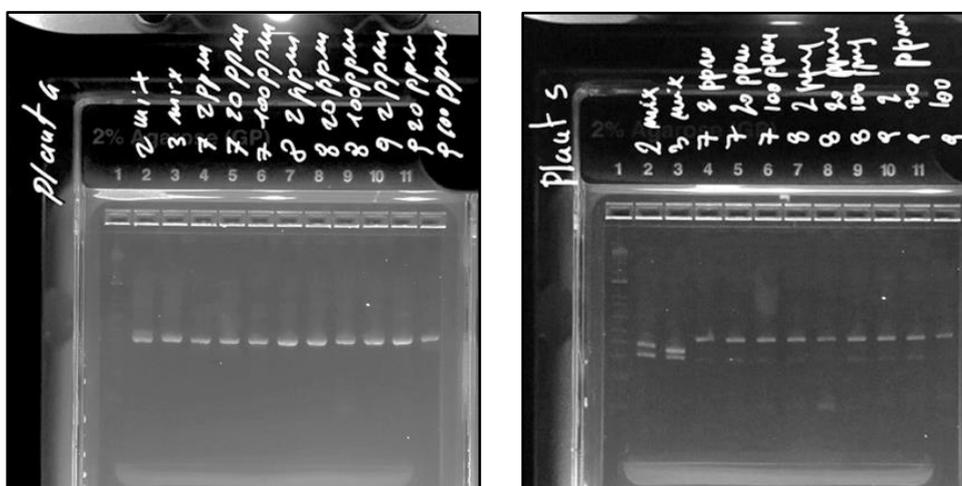


Figura 21 – Visualizzazione in gel di agarosio dei prodotti di amplificazione ottenuti con i kit *Plant 4* (immagine a sinistra) e *Plant 5* (immagine a destra). Legenda pozzetti (primo n° - pozzetto; secondo n° - ID campione) 1: Marcatore (100bp ogni banda); 2: 2mix; 3: 3mix; 4: 7-2ppm; 5: 7-20ppm; 6: 7-100ppm; 7: 8-2ppm; 8: 8-20ppm; 9: 8-100ppm; 10: 9-2ppm; 11: 9-20ppm; 12: 9-100ppm.

Dalla visualizzazione dei gel si vede che i frammenti di DNA bersaglio, legati agli adattatori e ai *barcodes*, sono stati amplificati correttamente. Gli ampliconi presentano un peso molecolare di circa 400 bp, come richiesto dalla metodica. Sulla base dell’intensità delle bande visibili in gel è stata unita

un'aliquota (1-2  $\mu$ L) di ciascun amplicone, in modo da avere una concentrazione equimolare di DNA nelle library.

La fase successiva prevede la pulizia delle due *library* che serve a purificare i prodotti della PCR dall'eccesso di nucleotidi, primers, sali ed enzimi, possibili inibitori nelle fasi successive d'analisi. Per fare ciò è stata eseguita la procedura di purificazione Agencourt® AMPure® XP PCR (Beckman Coulter) che consente un'elevata capacità di purificazione dei prodotti di PCR. Questa tecnologia utilizza sfere paramagnetiche di immobilizzazione reversibile in fase solida (SPRI) dotate di carica positiva in modo che possano legare frammenti di DNA (carica negativa) con peso molecolare  $\geq$  100 bp.

La procedura consiste in tre fasi:

- Legame selettivo dei frammenti di DNA con le biglie e successiva separazione delle microsfele con applicazione di un campo magnetico.
- Lavaggio delle sfere per rimuovere i contaminanti.
- Rimozione degli ampliconi purificati dalle sfere.

Eseguita la pulizia e quantificazione delle *library*, si è passati alla preparazione delle sfere di amplificazione da caricare nel chip per eseguire l'analisi NGS. A tale scopo i frammenti di DNA, legati ai *barcodes* e agli adattatori, sono stati sottoposti ad amplificazione tramite PCR in emulsione nel sistema Ion One Touch™ 2 (OT2) (Life Technologies™), per ottenere la quantità di DNA necessaria a procedere con la preparazione delle particelle Ion Sphere (ISP), seguendo il protocollo fornito dal kit Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit. L'amplificazione per emulsione viene eseguita perché è necessario amplificare i segnali prima del sequenziamento e questa fase è sempre presente, indipendentemente del sistema di amplificazione utilizzato.

In breve, la procedura prevede:

1. Legame dei frammenti di DNA alle particelle ISPs utilizzando degli adattatori che si trovano sulle sfere e gli adattatori presenti nell'estremità dei frammenti;
2. Amplificazione tramite PCR dei frammenti di DNA associati alle sfere. Ogni ISP viene emulsionata in una goccia d'acqua e aggiunta ai reagenti per la PCR (DNA polimerasi, *primers*, tamponi, dNTPs). Gli adattatori sulla superficie delle ISPs fungono da *primers* per la Taq polimerasi nella sintesi del frammento complementare;

3. Arricchimento delle sfere ISPs positive, ossia di quelle che presentano almeno un frammento di DNA sulla superficie (ISPs mono- o policlonali). Le ISPs vuote vengono scartate in questo passaggio;
4. Le ISPs con i frammenti amplificati vengono caricate nel *chip* per il successivo sequenziamento mediante il sistema Ion Torrent;
5. Analisi di sequenziamento ed elaborazione dei dati ottenuti.



Figura 22 – Sistema Ion One Touch™ 2 (Life Technologies™). Immagine a sinistra: Ion One Touch™ ES (arricchimento delle ISPs positive); immagine a destra: Ion One Touch™ 2 (OT2) (amplificazione mediante PCR in emulsione).

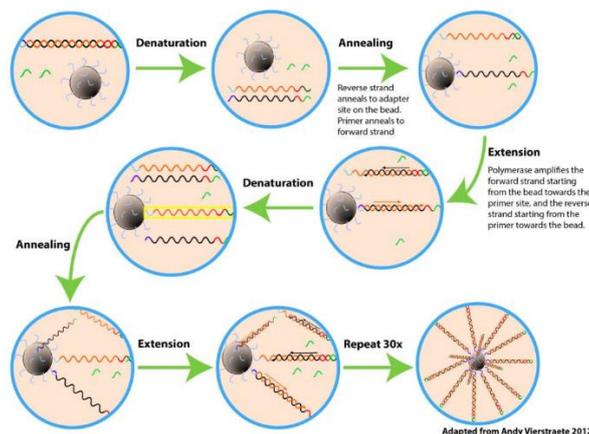


Figura 23- Rappresentazione schematica che illustra le tre fasi dell'amplificazione PCR in emulsione (denaturazione, annealing e estensione) [73].

La quantificazione delle *library*, ripulite da eventuali contaminanti, è stata eseguita utilizzando il fluorimetro Qubit® 3.0 per calcolare la diluizione necessaria in modo da ottenere un valore pari a 7 pmoli in 25  $\mu$ L.

Le ISPs con i frammenti amplificati vengono caricati nel *chip* per il successivo sequenziamento mediante il sistema Ion Torrent seguendo la procedura fornita [74]. I chip utilizzati in questo lavoro sono stati di due tipologie: Ion 314™ e 316™ Chip v2. La differenza tra queste chip è che il primo ha a disposizione 1 milione di pozzetti e il secondo ne ha 6 milioni.

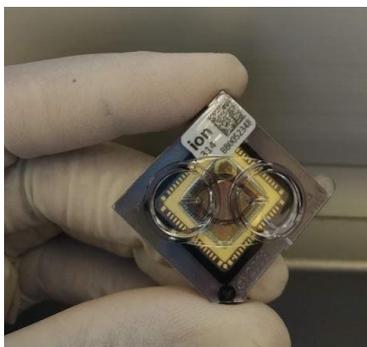


Figura 24 – Ion 314™ Chip v2.

## Analisi dei dati

L'output delle milioni di sequenze (*reads*) generate con il sistema Ion Torrent vengono combinate insieme, di solito in un file FASTQ, un tipo di file usato in biologia per memorizzare le sequenze genetiche, che eseguisce un controllo di qualità su le sequenze.

Il controllo viene eseguito in tre fasi: allineamento, che cerca le corrispondenze tra i *reads* ed il genoma di riferimento; *variant calling* (analisi delle variazioni) che separa le differenze dovute ad errori genetici da quelli strumentali, quindi elimina i *reads* di minor qualità; filtraggio ed annotazione, che allineano i *reads* al genoma di riferimento [64].

## 14.3 Real-time PCR

L'obiettivo di questa analisi è stato quello di verificare la sensibilità e la specificità di cinque sistemi (Anacardo, Arachide, Noce Comune, Pinolo, Soia) applicati ai campioni di DNA estratti dalle matrici alimentari, nel rilevamento delle specie allergeniche presenti. Come controllo positivo d'avvenuta amplificazione è stato usato il sistema endogeno 18S per confermare che le condizioni di amplificazione siano idonei a generare degli ampliconi.

## Campioni

I campioni di allergeni vegetali usati per svolgere quest'analisi sono gli stessi riportati nella Tabella 4. A partire dai campioni puri sono state formate delle matrici alimentari aggiungendo ad 1 g di farina tipo "00", 100 mg di ciascun allergene (anacardo, arachide, mandorle, nocciola, noce brasiliana, noce comune, noce di macadamia, noce pecan, pinolo, pistacchio e sesamo).

## Estrazione e Quantificazione del DNA genomico totale

L'estrazione e la quantificazione del DNA genomico sono state eseguite con le stesse modalità usate per l'analisi con la tecnica del DNA Barcoding descritto in precedenza.

## *Primers e sonde*

I *primers* e le sonde (*probes*) usati in quest'analisi sono stati sintetizzati da Eurofins Genomics (Ebersberg, Germania), e sono riportati in Tabella 11.

Allergene	Target	ID	Primers sonde	Reporter	Quencher	Sequenza	Conc. [nM]	Fonte
Anacardo	2S albumin gene	Cash_P	Sonda	FAM	TAMRA	ACAGAAGGTGCCGCTGCCAGAA	200	Journal of Food and Nutrition Research (2007) 46 (3) 101-104
		Cash_F	Forward	-	-	TGCCAGGAGTTG CAGGAAGT	150	
		Cash_R	Reverse	-	-	GCTGCCTCACCATTTGCTCTA	150	
Noce comune	ITS1	Wall_P	Sonda	FAM	BHQ	TGACCCGTCGTGTGTGCC	1000	I.M. López-Calleja et al. / Food Chemistry 177 (2015) 111–119
		Wall_F	Forward	-	-	GACAATCGGTGGTTGAGAAA	300	
		Wall_R	Reverse	-	-	GTCGAGGAGCACCTTCACAG	900	
Sistema Universal	18S rRNA	18S_P	Sonda	FAM	BHQ	CGCTATTGGAGCTGGAATTACC	1000	I.M. López-Calleja et al. / Food Chemistry 177 (2015) 111–125
		18S_F	Forward	-	-	TGGTGCCAGCAGCCGC	300	
		18S_R	Reverse	-	-	TCCAACACGAGCTTTTAACTGCA	900	
Arachide	trnH-psbA	AratrnsP	Sonda	FAM	BHQ	TGATATTGCTCCTTTACTTTCAAAA	200	Caroline Puente-Lelievre and Anne C. Eischeid / J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 8623-8629
		AratrnsF	Forward	-	-	AGGAGCAATAGAACTGCGT	500	
		AratrnsR	Reverse	-	-	TTTTTGCTTAAGGGATACGAGT	500	
Pinolo	tRNA-Leu	PP-trnL_P	Sonda	FAM	TAMRA	TTCAACTCGAATCTGGCATCT	200	Garino et al./ Food Chemistry 194 (2016) 980–985
		PP-trnL_F	Forward	-	-	CCTCGTCCAACCTTTTATTCC	300	
		PP-trnL_R	Reverse	-	-	AAACTGGCGATCAGAACTGA	300	
Soia	JRC Lec	Lec_P	Sonda	VIC	TAMRA	CTTCACCTTCTATGCCCTGACAC	5000	Joint Research Centre.
		Lec_F	Forward	-	-	CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC	15000	
		Lec_R	Reverse	-	-	GAAGGCCCCATCTGCAAGCC	15000	

Tabella 11 -Primers e sonde (*probes*) usati nell'amplificazione tramite *Real-time* PCR.

## Reazione di amplificazione tramite *Real-time* PCR su DNA estratto dalle matrici

Lo studio della specificità si basa nel fatto che l'amplificazione possa generare dei falsi positivi, ossia, i set di primers e le sonde usati possono non essere specifici solo per un gene, e quindi possono generare oltre agli ampliconi che corrispondono al DNA *target* altri ampliconi in altri campioni (cross reattività). Per ogni sistema analizzato è stata preparata una miscela con i seguenti reagenti:

### Sistema Anacardo

Reagente	Volume [ $\mu$ L]
Acqua Milli-Q®	4.00
Sonda	0.40
<i>Primer Forward</i>	0.30
<i>Primer Reverse</i>	0.30
Master Mix (TaqMan® GeneExpression)	1000

### Sistema Noce comune/Sistema endogeno 18S

Reagente	Volume [ $\mu$ L]
Acqua Milli-Q®	0.60
Sonda	2.00
<i>Primer Forward</i>	0.60
<i>Primer Reverse</i>	1.80
Master Mix (TaqMan® GeneExpression)	10.00

### Sistema Arachide

Reagente	Volume [ $\mu$ L]
Acqua Milli-Q®	2.60
Sonda	.40
<i>Primer Forward</i>	1.00
<i>Primer Reverse</i>	1.00
Master Mix (TaqMan® GeneExpression)	10.00

### Sistema Pinolo

Reagente	Volume [ $\mu$ L]
Acqua Milli-Q®	4.40
Sonda	0.20
<i>Primer Forward</i>	0.20
<i>Primer Reverse</i>	0.20
Master Mix (TaqMan® GeneExpression)	10.00

### Sistema Soia

Reagente	Volume [ $\mu$ L]
Acqua Milli-Q®	4.65
Sonda	0.05
<i>Primer Forward</i>	0.15
<i>Primer Reverse</i>	0.15
Master Mix (TaqMan® GeneExpression)	10.00

Tabelle 1 - Le diverse ricette per l'amplificazione del DNA target dei varie sistemi analizzati.

La sensibilità è la minima quantità di DNA (misurata in numero di coppie) che si riesce a determinare in un'analisi d'amplificazione tramite *real-time* PCR.

Lo studio della sensibilità è stato fatto procedendo a tre diluizioni delle matrici preso in esame fino ad ottenere concentrazioni pari a 100 ppm, 20 ppm e 2 ppm.

Il quantitativo di DNA di ciascun campione aggiunto ad ogni miscela è stato di 5 µL (volume finale PCR=20 µL). Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicati.

Le amplificazioni sono state eseguite nel termociclatore 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem™) ed il programma termico usato per le prove di specificità è stato il seguente: 95°C per 10 minuti necessari per l'attivazione della TaqMan, seguito da 45 cicli composti da due passaggi: 95°C per 15 secondi (denaturazione) e 60°C per 60 secondi (*annealing* ed estensione).

Le prove svolte per valutare la sensibilità sono state eseguita usando i profili termici riportati nella Tabella 12.

Allergene	Denaturazione		Annealing ed Estensione				N° Cicli (x)
	Temp. (°C)	Temp (min)	Temp. (°C)	Tempo	Temp (°C)	Tempo	
<b>Anacardio</b>	95	5	95	15 s	60	1 min	50
<b>Arachide</b>	95	10	95	15 s	60	1 min	40
<b>Noce comune</b>	95	10	95	5 s	60	30 s	50
<b>Pinolo</b>	95	15	95	15 s	60	1 min	40
<b>Soia</b>	95	10	95	15 s	60	1 min	45
<b>18S UNIV</b>	95	10	95	15 s	60	1 min	1

Tabella 12 – Programma termico per l'amplificazione tramite Real-time PCR

## 14.4 HERACLES II

Per quanto riguarda l'analisi di *fingerprinting* dei composti volatili, il lavoro è stato svolto nell'area di chimica del Laboratorio Coop Italia. Questa analisi ha utilizzato il naso elettronico HERACLES II (Alpha M.O.S., Toulouse, France), rappresentato nella Figura 16, che è basato sulla gascromatografia ultraveloce.

HERACLES II è dotato di due colonne che funzionano in modo parallelo: una colonna non polare (MXT5: 5% difenil, 95% dimetil-polisilossano, 10 m di lunghezza e 180  $\mu\text{m}$  di diametro) e una colonna leggermente polare (MXT1701: 14% di cianopropilfenile, 86 % dimetil-polisilossano, 10 m di lunghezza e 180  $\mu\text{m}$  di diametro). La differenza di polarità tra le due colonne non è elevata, ma è sufficiente per potere ottenere due cromatogrammi indipendenti che registrano informazioni diverse tra di loro.

I campioni analizzati in questo lavoro di Tesi sono i seguenti:

<b>Codifica campione</b>	<b>Composizione</b>
<b>4.1.1</b>	farina + arachidi (100 mg)
<b>5.1.1</b>	farina + arachidi (10 mg)
<b>6.1.1</b>	farina + arachidi (2 mg)
<b>7.1.1</b>	farina + noce (50mg) + arachidi (50mg)
<b>8.1.1</b>	farina + noce (90mg) + arachidi (10mg)
<b>9.1.1</b>	farina + noce (10mg) + arachidi (90mg)

Tabella 13 – Campioni di matrici analizzati con il gascromatografo HERACLES II.

L'analisi nel gascromatografo HERACLES II non prevede pre-trattamenti dei campioni. Questo è sicuramente un vantaggio che si traduce nella riduzione dei tempi di analisi e nella totale assenza di contaminazioni dovute a manipolazioni del campione prima dell'analisi strumentale. I campioni sono stati analizzati in quadruplicato. Una provetta vuota (*vial*) viene usata come bianco.

Per procedere alla fase di analisi, un'aliquota di polvere di ciascun campione ( $1 \text{ g} \pm 1\%$ ) è stata posta in una provetta di vetro da 20 mL, poi sigillata con un tappo magnetico. Le provette sono state posizionate nell'auto-campionatore di HERACLES II, che procede a sistemare i campioni nel fornetto agitatore per 20 minuti a 50 °C, con agitazione pari a 500 *rpm*. Tale fase serve a sviluppare la frazione volatile che si concentra nello spazio di testa delle provette.



Figura 25 - Un campione di farina “spikata” con l’allergene.

Successivamente, una siringa presente nello strumento va a perforare il setto di silicone del tappo magnetico per campionare 5 mL dello spazio di testa. Il prelievo di uno spazio di testa così elevato, invece di quello normalmente utilizzato con le tecniche gascromatografiche convenzionale (pochi  $\mu\text{L}$ ), è una caratteristica peculiare di HERACLES II, e permette di analizzare un’aliquota molto più rappresentativa del campione in esame.

Prima della separazione cromatografica, l'aliquota dello spazio di testa da 5 ml viene adsorbita in una trappola *Tenax TA 60/80* e mantenuta a 60 °C per 65 secondi (sec) per concentrare gli analiti e rimuovere l'aria e l'umidità in eccesso. Per veicolare il campione alla trappola di concentrazione è stato utilizzato l'idrogeno.

Successivamente, segue la fase di desorbimento degli analiti dalla trappola per poter effettuare l’iniezione nelle colonne cromatografiche e la loro successiva rilevazione con i due rilevatori FID. Tale fase è stata eseguita aumentando la temperatura della trappola fino a 240 °C per 93 secondi.

Il programma termico è iniziato a 40 °C (per 2 sec) e aumentato fino a 270 °C a 3 °C  $\text{sec}^{-1}$ ; la temperatura finale è stata mantenuta per 21 sec. Il tempo di separazione totale era di 100 sec. Alla fine di ogni colonna è presente un rivelatore FID e il segnale acquisito è stato digitalizzato ogni 0,01 sec. Per la calibrazione, è stata utilizzata una soluzione di alcani (da n-esano a n-esadecano) per convertire il tempo di ritenzione negli indici di Kovats e identificare i composti volatili utilizzando un *software* specifico (AromaChemBase).

## 14. Risultati e Discussione

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di validare e ottimizzare metodi per la rivelazione delle specie vegetali allergeniche presenti nelle matrici alimentari. Matrici a base di farina o cioccolato al latte sono state create con aggiunta di quantità note di allergeni alimentari vegetali (Tabella 5 e 6). Altre 3 matrici sono state create mescolando insieme diversi allergeni. Le matrici "contaminate" sono state analizzate usando tecniche di biologia molecolare e chimiche per la rivelazione delle specie allergeniche vegetali presenti. Per verificare la presenza dei contaminanti (allergeni) nelle matrici, è stata usata in un primo momento la tecnica del DNA *Barcoding* ed in un secondo momento la tecnica della Reazione a Catena della Polimerasi in tempo reale (*Real-time PCR*). Inoltre, è stato utilizzato il gascromatografo ultraveloce HERACLES II (Alpha M.O.S, Toulouse, France) per discriminare i *fingerprint* (impronta digitale) dei composti volatili presenti nelle diverse matrici alimentari. Infine, è stata fatta l'elaborazione chemiometrica semplice dei dati ottenuti dai varie cromatogrammi.

La sessione "Risultati e Discussione" è divisa in 3 parti:

1. DNA *Barcoding*
2. *Real-time PCR*
3. HERACLES II

### 15.1 DNA *barcoding* e sequenziamento in Ion Torrent

La tecnica del DNA *barcoding* è una tecnica molecolare che consente di rivelare determinate specie, confrontando i marcatori genetici associati al DNA del campione (*barcodes*) con le sequenze di riferimento presenti in un *database*. Il successo di questa tecnica dipende dalla variabilità molecolare tra le specie e dalla disponibilità, nelle banche dati, di elevate quantità di sequenze di riferimento, cioè sequenze di DNA di specie già conosciute.

In un lavoro precedente è stata verificata l'applicazione del kit commerciale SGS<sup>TM</sup> *All Species ID Plant DNA Analyser* per l'identificazione di specie allergeniche vegetali tramite la tecnica del DNA *Barcoding* [75]. La procedura, eseguita anche in questo lavoro di Tesi, ha previsto l'estrazione del DNA genomico dagli allergeni puri (12 in totale) e il successivo sequenziamento con il sistema Ion Torrent. Il risultato ottenuto è stato prevalentemente positivo: quasi la totalità delle specie allergeniche vegetali analizzate con questa metodica sono state identificate. Nella Tabella 13 sono riportati i risultati.

## Interpretazione dei risultati

Nella colonna “SPECIE ATTESE” sono indicate le specie presenti nelle matrici alimentari, nella colonna “SPECIE IDENTIFICATE” quelle rilevate dal *software* dal confronto delle sequenze presenti nei *database* di riferimento, e per ultimo, nella colonna “N° *READS*” il numero di sequenze generate.

<b>ALLERGENE</b>	<b>SPECIE ATTESE</b>	<b>SPECIE IDENTIFICATE</b>
<b>Anacardo</b>	<i>Anacardium occidentale</i>	<i>Anacardium occidentale</i>
<b>Arachide</b>	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Arachis hypogaea</i>
<b>Mandorla</b>	<i>Prunus dulcis</i>	<i>Prunus sp. /Prunus dulcis</i>
<b>Nocciola</b>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Corylus sp.</i>
<b>Noce comune</b>	<i>Junglas regia</i>	<i>Juglans regia</i>
<b>Noce brasiliana</b>	<i>Bertholletia excelsa</i>	<i>Bertholletia sp. /Eschweilera sp.</i>
<b>Noce di cocco</b>	<i>Cocos nucifera</i>	n.d.
<b>Noce di macadamia</b>	<i>Macadamia integrifolia</i>	<i>Macadamia sp.</i>
<b>Noce pecan</b>	<i>Carya illinoensis</i>	<i>Carya illinoensis</i>
<b>Pinolo</b>	<i>Pinus pinea</i>	n.d.
<b>Pistacchio</b>	<i>Pistachia vera</i>	<i>Pistacia vera</i>
<b>Sesamo</b>	<i>Sesamum indicum</i>	<i>Sesamum indicum</i>

Tabella 14 – Riassunto dei risultati del sequenziamento NGS (Ion Torrent) usando il DNA dei campioni di allergeni puri. Legenda: n.d. – non determinabile. Adattato da: [75].

Come si vede nella tabella, su dodici allergeni puri analizzati, sei sono stati identificati in maniera univoca (anacardo, arachide, noce comune, noce pecan, pistacchio e sesamo), in quanto l’analisi delle sequenze ottenute riesce ad identificare la specie allergenica presente; quattro presentano un risultato ambiguo (mandorla, nocciola, noce brasiliana e di macadamia), dato che la specie non viene identificata ma il genere (*sp.*) viene definito; infine due (cocco e pinolo) non sono stati identificati (nota: nel momento in cui è stato svolto lo studio, il pinolo non era presente nel *database* utilizzato per l’analisi e per il confronto delle sequenze).

Per svolgere l’analisi mediante l’impiego della tecnica del DNA *Barcoding* è stato estratto il DNA genomico totale delle singole matrici alimentari (Tabella 6). Successivamente il DNA è stato quantificato per verificarne la quantità e la purezza. Tutti i campioni presentavano risultati accettabili. Dopodiché, sono stati amplificati i frammenti del DNA *target* di tutti i campioni mediante il kit commerciale *All Species ID Plant Analyser*. Ai frammenti di DNA così ottenuti sono stati aggiunti

dei *barcodes* e due adattatori all'estremità, richiesti per l'amplificazione con il sistema Ion Torrent. I *barcodes* sono sequenze brevi di DNA che fungono da codici a barre per l'identificazione univoca dei diversi campioni che vengono messi insieme nella creazione delle *library* e successivamente sequenziati (sequenziamento multi determinativo). Due *library* (*Plant 4* e *Plant 5*) sono state preparate e caricate nei *chip* per la "corsa" nel sequenziatore Ione Torrent PGM™ come descritto nella sessione "Materiali e Metodi".

In una prima fase, sono state analizzate le matrici alimentari riportate in 4Tabella 4. I risultati ottenuti usando il *chip* Ion 314™ sono riportati nella Tabella 14.

ID CAMPIONE	SPECIE ATTESE	SPECIE IDENTIFICATE	N° READS
<b>2 Mix</b>	<i>Carya illinoensis</i>	<i>Carya illinoensis</i>	1205
	<i>Cocos nucifera</i>	n.d.	
	<i>Juglans regia</i>	<i>Juglans regia</i>	2611
	<i>Pistacia vera</i>	<i>Pistacia vera</i>	4698
	<i>Prunus dulcis</i>	<i>Prunus sp. /Prunus dulcis</i>	3687
<b>3 Mix</b>	<i>Anacardium occidentale</i>	<i>Anacardium sp.</i>	5364
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.	
	<i>Bertholletia excelsa</i>	<i>Bertholletia sp. /Eschweilera sp.</i>	194
	<i>Macadamia integrifolia</i>	<i>Macadamia sp.</i>	3156
	<i>Pinus pinea</i>	n.d.	
	<i>Sesamum indicum</i>	n.d.	
<b>TUTTO</b>	<i>Anacardium occidentale</i>	<i>Anacardium sp.</i>	2185
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.	
	<i>Bertholletia excelsa</i>	<i>Bertholletia sp. /Eschweilera sp.</i>	195
	<i>Carya illinoensis</i>	<i>Carya illinoensis</i>	872
	<i>Cocos nucifera</i>	n.d.	
	<i>Juglans regia</i>	<i>Juglans regia</i>	1333
	<i>Macadamia integrifolia</i>	<i>Macadamia sp.</i>	2787
	<i>Pinus pinea</i>	n.d. <sup>5</sup>	
	<i>Pistacia vera</i>	<i>Pistacia vera</i>	1265
	<i>Prunus dulcis</i>	<i>Prunus sp. /Prunus dulcis</i>	1330
<i>Sesamum indicum</i>	n.d.		

Tabella 15 – Risultati dell'analisi del sequenziamento delle matrici alimentari in esame tramite NGS (Ion Torrent) con le specie allergeniche identificate ed il rispettivo n° di *reads*. Legenda: n.d. – non determinabile.

<sup>5</sup> Il pinolo non esiste nel *database*.

I risultati riportati in tabella indicano che in alcune matrici le specie sono state identificate in maniera univoca, mentre in altre sono ambigue o non sono state identificate.

In particolare, nella matrice “**2 Mix**”, su cinque specie presenti, tre sono state identificate in maniera univoca: noce comune (*Junglas regia*), noce pecan (*Carya illinoensis*) e pistacchio (*Pistacia vera*), una presenta un risultato ambiguo (mandorla), dove il sistema ha identificato il genere (*Prunus*) e non la specie (*dulcis*), e una non è stata rilevata (*Cocos nucifera*).

Il pistacchio non viene identificato in quest’analisi perché la specie non è ancora presente nei depositi di riferimento delle sequenze.

Il risultato ambiguo *Prunus sp. /Prunus dulcis*, nonostante il numero di sequenze (*reads*) disponibili per l’analisi sia stato elevato, il genere viene identificato correttamente mentre l’identificazione della specie è ambigua. Questo può essere dovuto ad una somiglianza intrinseca molto elevata tra le specie del genere *Prunus*.

Nella matrice “**3 Mix**”, le specie allergeniche identificate sono state tre su sei: anacardo (*Anacardium occidentale*), noce brasiliana (*Bertholletia excelsa*) e noce di macadamia (*Macadamia integrifolia*).

Tuttavia il risultato è ambiguo e le specie anacardo (*Anacardium occidentale*) e noce di macadamia (*Macadamia integrifolia*) non sono state identificate.

Nel caso della noce brasiliana sono stati identificati due generi (*Bertholletia* e *Eschweilera*) che appartengono alla stessa famiglia “*Lecythidoideae*”, però la specie “*excelsa*” non viene identificata.

In questo caso, come è già stato detto in precedenza, la tecnica del DNA *Barcoding* non fornisce risultati soddisfacenti perché trattandosi di una stessa famiglia le variabilità interspecifiche sono molto basse. Questo risultato mette in luce una delle principali problematiche di questa tecnica quando applicata nell’identificazione delle piante. Infatti, se nel mondo animale è stato identificato un unico gene la cui ipervariabilità permette di distinguere anche specie evolutivamente affini tra loro (citocromo c ossidasi subunità I, COI), nel mondo vegetale è stato necessario identificare 5 geni *target* (matK, rbcL, trnH-psbA, ITS1 e ITS2) senza riuscire a coprire completamente la variabilità di tale regno.

L’arachide, il pinolo ed il sesamo invece non sono stati identificati nella matrice analizzata.

Nella matrice “**Tutto**” sono state rivelate tre specie allergeniche in maniera univoca (noce comune, noce pecan e pistacchio), quattro sono ambigue (anacardo, mandorla, noce brasiliana e noce di macadamia). Invece, non sono state determinate le specie allergeniche arachide, cocco e pinolo.

Essendo l’ingestione di questi alimenti (anche se in tracce) pericolosa per la salute delle persone atopiche, la metodica sviluppata presenta delle buone potenzialità nella determinazione di specie

vegetali allergeniche, in quanto riesce a fornire buoni risultati sulla presenza/assenza delle specie vegetali nelle matrici: nel caso in cui non riesca ad identificare la specie riesce comunque ad identificare il genere.

È quindi necessario migliorare il metodo per identificare anche le specie non rilevate durante le prove. La mancata identificazione può essere dovuta alle varie fasi di amplificazione (bassa specificità dei *primers* per il DNA *target* di ogni campione), alla fase di elaborazione dei dati da parte del *software* (che esegue dei *cut-off* nelle varie fasi di allineamento delle sequenze) o semplicemente la specie non è ancora disponibile nel *database*.

Ad esempio, nel caso della noce di macadamia la definizione del genere *Macadamia sp.* può essere sufficiente per indicare l'allergenicità del campione che lo presenta. Nel caso della mandorla, invece, l'indicazione *Prunus sp. /Prunus dulcis* può portare a falsi positivi: questo perché il sistema non riesce ad arrivare a determinare l'esatta specie allergica del genere *Prunus*.

In una seconda prova, è stata valutata l'effetto delle matrici sull'identificazione delle specie allergeniche vegetali.

Nella Tabella 15 sono riportati i risultati ottenuti usando per il sequenziamento un chip Ion 314™.

ID CAMPIONE	SPECIE ATESE	SPECIE IDENTIFICATE	N° READS
<b>10</b> (arachide 50mg e noce 50mg)	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Juglans regia</i>	<i>Arachis hypogaea</i> <i>Juglans regia</i>	1179 8640
<b>11</b> (arachide 10 mg e noce 90 mg)		<i>Arachis hypogaea</i> <i>Juglans regia</i>	n.d. 13998
<b>12</b> (arachide 90mg e noce 10mg)		<i>Arachis hypogaea</i> <i>Juglans regia</i>	1455 6049

Tabella 16 – Risultati dell'analisi del sequenziamento della matrice cioccolato al latte analizzati tramite NGS (Ion Torrent) con le specie identificate ed il rispettivo n° di *reads*. Legenda: n.d. – non determinabile; noce - noce comune.

I risultati dimostrano che non ci sono grosse effetti di inibizione da parte della matrice nel rivelamento delle specie allergeniche. In particolare, nella matrice “10” dove gli allergeni sono presenti in quantità equimolare, tutte le due specie sono state identificate in maniera univoca.

Nella matrice “12” sono state rivelate le due specie presenti, arachide e noce comune.

Da notare che le specie del cacao presenti nella matrice non vengono rivelate. Questo può essere dovuto ai processi di lavorazione che degradano in maniera irreversibile il loro DNA, non permettendo che venga neanche estratto.

Un altro risultato interessante è la non rivelabilità dell'arachide nella matrice "11". Da notare che le specie del cacao presenti nella matrice non vengono rivelate. Questo può essere dovuto ai processi di lavorazione che degradano in maniera irreversibile il DNA, impedendone l'estrazione.

### Prove di sensibilità del metodo nel rivelamento di specie allergiche vegetali (arachide e noce) presenti nella farina tipo "00"

In questa analisi si è cercato di determinare la minima quantità di allergene che fosse possibile rivelare dentro la matrice contaminate appositamente usando la tecnica del DNA *Barcoding*.

I campioni usati in quest'analisi sono stati ottenuti procedendo a diluizioni seriali del DNA genomico totale estratto dalle diverse matrici (Tabella 5) con il DNA della farina tipo "00".

I risultati di quest'analisi sono presentati nella Tabella 16.

ID CAMPIONE	SPECIE ATESE	SPECIE IDENTIFICATE	N° READS (Chip Ion 314™)	N° READS (Chip Ion 316™)
7- 2ppm	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	4125	62545
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.		
	<i>Juglans regia</i>	n.d.		
7- 20ppm	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	5245	69924
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.		
	<i>Juglans regia</i>	n.d.		
7- 100ppm	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	5086	96240
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.		
	<i>Juglans regia</i>	<i>Juglans regia</i>	54	578
8- 2ppm	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	7224	95088
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.		
	<i>Juglans regia</i>	n.d.		
8- 20ppm	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	5847	56745
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.		
	<i>Juglans regia</i>	n.d.		
8- 100ppm	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	5251	95396
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.		
	<i>Juglans regia</i>	<i>Juglans regia</i>	75	886
9- 2ppm	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	6628	68523
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.		
	<i>Juglans regia</i>	n.d.		
9- 20ppm	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	6364	146455
	<i>Arachis hypogaea</i>	n.d.		
	<i>Juglans regia</i>	n.d.		
9- 100ppm	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	5418	115478
	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	55	661
	<i>Juglans regia</i>	<i>Juglans regia</i>	69	860

Tabella 17 – Riassunto dei risultati dell’analisi del sequenziamento della matrice farina tipo “00” contaminata con noce ed arachide, analizzati tramite NGS (Ion Torrent). *Chip* usati Ion 314™ e Ion 316™.

Legenda: n.d. – non determinabile.

I risultati ottenuti e riportati nella Tabella 16 dimostrano che in tutte le matrici la specie di farina (*Triticum aestivum*) è rivelata, invece, le specie contaminanti non sempre sono state rivelate.

Un dato interessante è che sembra che il metodo abbia una maggiore “affinità” nel rivelare la noce (*Junglas regia*) a dispetto dell’arachide. In particolare, nelle matrici dove il rapporto delle specie presenti è 1:1, solamente la specie noce è stata identificata. Nella matrice con un rapporto tra le specie uguale a 9:1 essendo l’arachide la specie presente in minor quantità, l’arachide non è stata rivelata. Per ultimo, nella matrice con rapporto tra le due specie uguale a 9:1, tutte le due specie sono state identificate in maniera univoca.

I risultati sono stati ottenuti in due prove, dove sono i campioni sono stati analizzati nel sistema Ion Torrent le due tipologie di *chip*: *Chip Ion 314™* e *Chip Ion 316™*. Come si può vedere, tenendo in considerazione i risultati della Tabella 16, si vede che il numero di *reads* disponibili per l’analisi delle sequenze delle specie da parte del *software* aumenta quando si usa il *chip* 316™. Nonostante ciò, la capacità di rilevazione non migliora, e le specie identificate sono state sempre le stesse identificate con il *chip* 314™.

Pertanto, si ipotizza che il mancato rilevamento delle specie sia connesso più a problemi derivanti da basse efficienze di amplificazione disuguali tra specie diersse nelle varie PCR durante la creazione delle *library* (insieme di DNA proveniente da diverse specie), piuttosto che con le fasi di filtraggio e allineamento eseguiti dallo strumento Ion Torrent nella fase finale di sequenziamento.

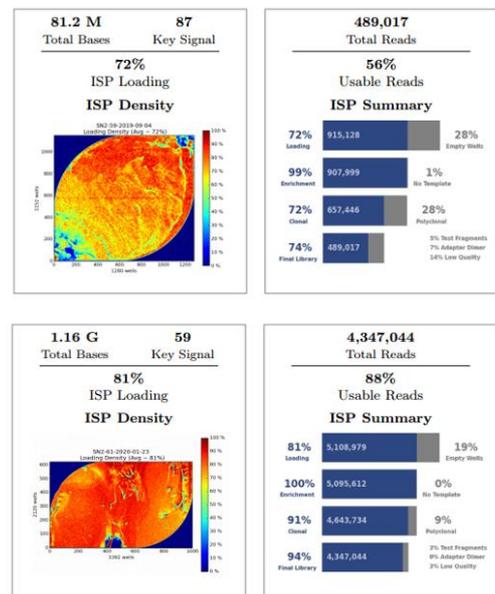


Figura 26 - Rapporto di qualità della corsa NGS eseguita con le due tipologie di *chip*. Immagine in alto: *chip* Ion 314™; immagine sotto: *chip* Ion 316™.

## 15.2 Real-time PCR per la rilevazione di allergeni vegetali

L'utilizzo della tecnica di amplificazione mediante *real-time* PCR fornisce un approccio utile per il rilevamento e l'identificazione di più specie vegetali che possono essere presenti in una matrice alimentare, fornendo risultati accurati ed affidabili. Per questi motivi, questa tecnica è uno strumento molto utilizzato e allo stesso tempo prezioso per la sicurezza alimentare. La tecnica del DNA *Barcoding* accoppiata a sequenziamento NGS, che è stata applicata nella rilevazione delle specie allergeniche descritte in precedenza, è risultata essere poco sensibile. Si è deciso, quindi, di validare la tecnica *real-time* PCR per verificarne l'applicabilità nella rivelazione di specie allergeniche vegetali in matrici alimentari opportunamente preparate in laboratorio.

A tale scopo, sono state eseguite analisi di specificità e sensibilità usando *set* di *primers* specifici per le specie allergeniche in esame. In particolare, sono stati analizzati cinque sistemi di amplificazione: anacardio (*Anacardium occidentale*), arachide (*Arachis hypogaea*), noce comune (*Junglas regia*), pinolo (*Pinus pinea*) e soia (*Glycine max*). I diversi *set* di *primers* e i protocolli utilizzati sono stati ricavati da lavori svolti in precedenza o da studi presenti in letteratura.

### Analisi della specificità e della sensibilità

Nella Tabella 1 sono riportati i valori dei cicli soglia, Ct, relativi ai vari sistemi analizzati per verificare la specificità dei *set* di *primers* usati nell'amplificazione di ciascun campione.

Allergene	Anacardo	Arachide	Noce comune	Pinolo	Soia	18S UNIV
<b>Anacardio</b>	18.6	n.d.	31.8	33.3	35.7	12.7
<b>Arachide</b>	n.d.	15.5	32.2	32.1	35.2	13.2
<b>Mandorle</b>	n.d.	39.5	33.8	37.5	35.1	11.2
<b>Nocciola</b>	n.d.	40.4	31.6	33.0	35.0	12.4
<b>Noce comune</b>	37.0	32.3	11.1	34.7	34.0	12.5
<b>Noce brasiliana</b>	40.7	36.1	29.3	35.0	36.2	15.1
<b>Noce di macadamia</b>	39.1	37.3	29.1	35.4	35.1	11.8
<b>Noce pecan</b>	35.1	35.9	23.8	29.5	34.9	13.5
<b>Pinolo</b>	38.1	n.d.	29.2	16.3	35.8	12.8
<b>Pistacchio</b>	22.4	37.0	35.2	35.6	34.8	13.3
<b>Sesamo</b>	38.1	45.9	37.0	35.7	36.2	10.8
<b>Soia</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	21.2	n.a.

Tabella 18 – Analisi di specificità tramite *real-time* PCR per i diversi sistemi analizzati. I valori dei cicli soglia, Ct, sono calcolati per ogni sistema. Legenda: n.d. –non determinabile; n.a. –non analizzato.

Il controllo positivo (sistema endogeno 18S UNIV) dimostra che il DNA estratto da tutti i campioni è amplificabile, con valori di Ct che variano tra 10.8 e 15.1 cicli.

Analizzando i valori di Ct ottenuti, si può osservare che il DNA *target* è stato amplificato in quasi tutti i sistemi analizzati (cross-reattività).

L'analisi della specificità dimostra che i *set* di *primers* usati nelle reazioni di amplificazione sono specifici quando il sistema è validato contro se stesso (Ct evidenziati in tabella); sono state, tuttavia, avvenute delle amplificazioni aspecifiche in quasi tutti i sistemi studiati (corrispondenti ai valori di Ct più alti). Per esempio, il *set* di *primers* usati per amplificare la noce (ITS1), è quello più aspecifico dato che ha generato degli ampliconi in tutti i sistemi. Quindi, oltre a rivelare la specie specifica (Ct=11.1 cicli) ha rivelato tutte le altre specie. Nonostante i valori di Ct nel rilevamento di altre specie siano più elevati, questa cross-reattività non può considerarsi un falso positivo.

È stata, inoltre, valutata la sensibilità dei diversi sistemi per verificare l'efficienza di amplificazione della *real-time* PCR.

Nella Tabella 19 sono riportati le varie prove di sensibilità applicati ai diversi sistemi analizzati, per verificare la capacità di rilevare diverse concentrazioni (100, 20 e ppm) di specie allergeniche in matrici alimentari.

Allergene	Conc. [ppm]	Anacardo	Arachide	Noce comune	Pinolo	Soia
<b>Pinolo</b>	100	n.d.	n.d.	37.3	25.5	n.a.
	20	n.d.	n.d.	37.0	28.5	n.a.
	2	n.d.	n.d.	34.8	31.9	n.a.
<b>Anacardo</b>	100	35.8	n.d.	37.5	n.d.	n.a.
	20	37.9	n.d.	36.6	n.d.	n.a.
	2	40.9	n.d.	37.7	n.d.	n.a.
<b>Sesamo</b>	100	n.d.	n.d.	36.6	n.d.	n.a.
	20	n.d.	n.d.	38.7	n.d.	n.a.
	2	n.d.	n.d.	35.6	n.d.	n.a.
<b>Noce comune</b>	100	n.d.	n.d.	23.9	n.d.	n.a.
	20	n.d.	n.d.	26.3	n.d.	n.a.
	2	n.d.	n.d.	29.8	n.d.	n.a.
<b>Noce pecan</b>	100	n.d.	n.d.	36.0	n.d.	n.a.
	20	n.d.	n.d.	37.2	n.d.	n.a.
	2	n.d.	n.d.	37.4	n.d.	n.a.
<b>Noce brasiliana</b>	100	n.d.	n.d.	36.8	n.d.	n.a.
	20	n.d.	n.d.	37.2	n.d.	n.a.
	2	n.d.	n.d.	37.0	n.d.	n.a.
<b>Nocciola</b>	100	n.d.	n.d.	37.2	n.d.	n.a.
	20	n.d.	n.d.	35.9	n.d.	n.a.
	2	n.d.	n.d.	36.7	n.d.	n.a.
<b>Arachide</b>	100	n.d.	28.8	37.5	n.d.	n.a.
	20	n.d.	31.6	40.2	n.d.	n.a.
	2	n.d.	32.3	37.6	n.d.	n.a.
<b>Noce di macadamia</b>	100	n.d.	n.d.	36.7	n.d.	n.a.
	20	n.d.	n.d.	38.1	n.d.	n.a.
	2	n.d.	n.d.	37.0	n.d.	n.a.
<b>Pistacchio</b>	100	41.2	n.d.	37.7	n.d.	n.a.
	20	44.2	n.d.	37.8	n.d.	n.a.
	2	n.d.	n.d.	37.0	n.d.	n.a.
<b>Mandorle</b>	100	n.d.	n.d.	36.3	n.d.	n.a.
	20	n.d.	n.d.	38.0	n.d.	n.a.
	2	n.d.	n.d.	37.4	n.d.	n.a.
<b>Soia</b>	100	n.d.	n.d.	37.1	n.d.	36.0
	20	n.d.	n.d.	38.0	n.d.	38.6
	2	n.d.	n.d.	36.9	n.d.	41.3

Tabella 19 – Analisi della sensibilità dei sistemi contro tutti i campioni in esame.

Se si considera un valore di Ct limite uguale a 35 cicli, al di sopra del quale si verificano delle reattività crociate con altre specie (amplificazioni aspecifiche ed inaffidabili), si può concludere che i sistemi studiati presentano buone potenzialità nel rilevamento di specie allergeniche vegetali, quando sono presenti in una matrice alimentare fino alla concentrazioni di 2 ppm. Sono state, tuttavia, evidenziate delle differenze nella sensibilità del sistema. Ad esempio, il sistema anacardo può essere sensibile nel rilevamento della propria specie se presente in concentrazioni fino a 20 ppm. I sistemi arachide e pinolo, invece, sono risultati sensibili fino ad una concentrazione di 2 ppm e non presentano cross-reattività con le altre specie. Il sistema per il rivelamento della noce può essere considerato sensibile fino ad una concentrazione di 2 ppm, ma ha generato dei positivi per le altre specie, con valori di Ct superiori al valore limite. Nel caso che il Ct limite fosse uguale a 30 cicli, il sistema noce può essere considerato sensibile nel rilevamento di altre specie.

In base a questi risultati, sebbene la tecnica *Real-time* PCR abbia dimostrato delle potenzialità nel rilevamento delle specie allergeniche vegetali presenti nelle matrici alimentari analizzate, la sua applicazione sarebbe ancora limitata ad una analisi solamente qualitativa (presenza o assenza dell'allergene). Questo perché i sistemi non sono molto specifici e la sensibilità di 2 ppm può non essere sufficiente per garantire che una matrice non sia contaminata da una specie allergenica. Le cross-reattività possono essere dovute alla scarsa variabilità tra le varie specie di noce, come è stato descritto in precedenza.

Questo sistema, tuttavia, può essere utilizzato come metodo preliminare di screening e, nel caso di positività ad un determinato allergene, dovranno seguire ulteriori analisi con tecniche più sensibili (ELISA).

## 15.3 Elaborazione chemiometrica dei dati

L'analisi chemiometrica dei dati comprende un'analisi dei cromatogrammi, la creazione della *library* e l'allineamento dei dati.

La Figura 27 mostra due cromatogrammi ottenuti dall'analisi di un campione di farina "contaminata" con gli allergeni noce ed arachide. Questi due cromatogrammi sono il risultato, come è stato detto in precedenza, della presenza di due diverse colonne poste in parallelo in HERACLES II. I picchi dei cromatogrammi non sono assegnati a nessun composto volatile specifico (*analisi untargeted*).

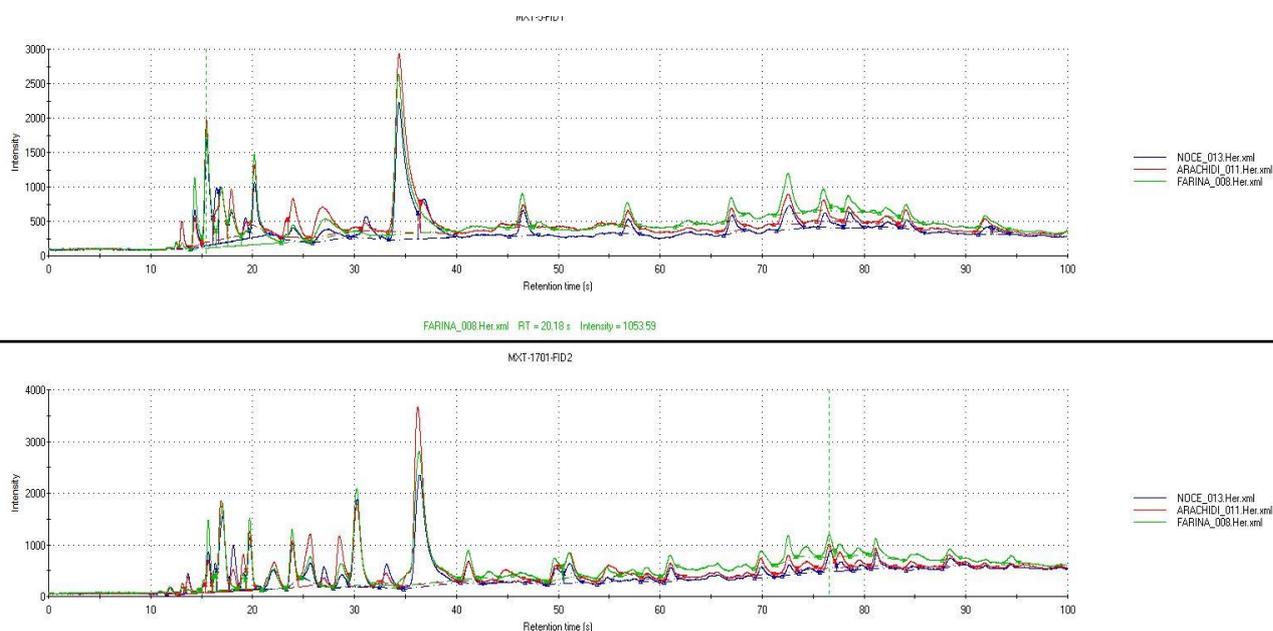


Figura 27 - Esempio di cromatogrammi ottenuti in questa analisi. Nel pannello in alto il tracciato ottenuto dalla colonna MXT5, in basso quello ottenuto dalla colonna MXT1701.

L'integrazione dei picchi per la costruzione della *library* (o *dataset*) iniziale è stata realizzata solamente per i picchi con tempi di ritenzione inferiori a 60 secondi, in quanto nella zona terminale dei cromatogrammi i picchi presenti sono dovuti a molecole volatili presenti nell'aria dell'ambiente dove vengono preparati i campioni (bianco).

L'analisi dei cromatogrammi e l'elaborazione dei dati è stata eseguita con il software integrato nello strumento HERACLES II che si basa sull'analisi delle componenti principali (PCA – *Principal Component Analysis*). L'analisi multivariata PCA permette la trasformazione delle variabili originali

in componenti principali (PC) con l'obiettivo di eliminare informazioni inutili (ad esempio uguali per tutti i campioni), ridurre la dimensionalità dei dati ed individuare eventuali *outliers*<sup>6</sup>.

Il risultato è uno *scores plot*, ovvero un grafico dove vengono riportati gli *scores*, cioè le nuove coordinate dei campioni, nello spazio delle componenti principali che indicano la varianza tra i campioni. Le analisi possono essere in 2D, come in questo caso, o in 3D se vengono utilizzati 3 assi, PC1, PC2 e PC3.

In prima istanza sono state eseguite delle analisi per esplorare la capacità di questo tipo di metodo di separare il materiale vegetale utilizzato, quindi la farina e due tipi di frutta a guscio. In seguito, si è cercato di verificare la capacità di identificare la presenza di uno o più contaminanti allergenici in una matrice semplice e di valutare il grado di "sensibilità" del sistema.

Nel Grafico A è rappresentata l'analisi PCA dei campioni puri, cioè quelli che sono stati utilizzati per formare le miscele insieme alla farina, utilizzata come base. Sono stati analizzati 3 replicati da 1 g di noce (NOCE), 1 g di arachide (ARACHIDE), 0.5 g di noce + 0.5 g di arachide (ARANOCE), 1 g di farina (FARINA).

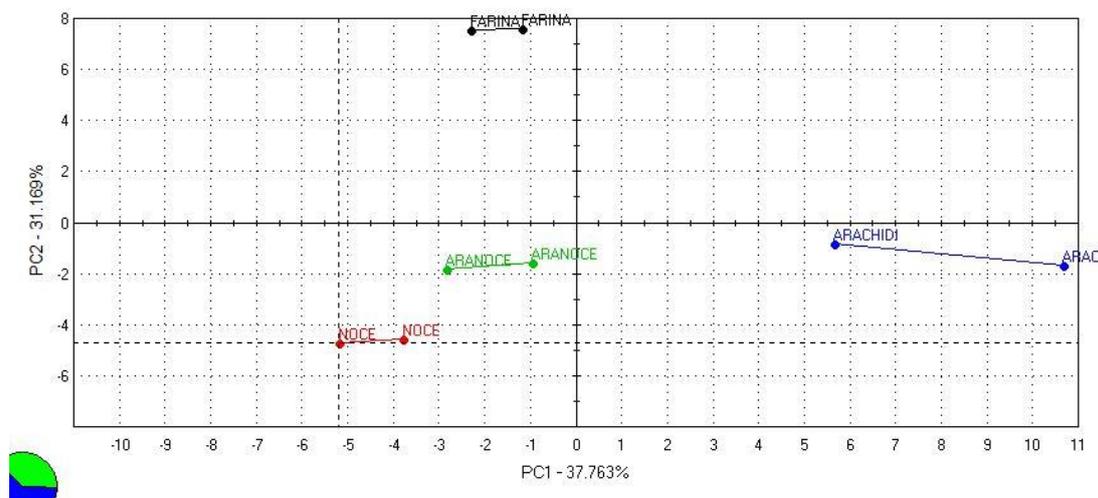


Grafico A - Rappresentazione grafica bidimensionale dell'analisi PCA del profilo dei composti volatili di farina (nero), noce (rosso), arachide (blu), noce + arachide 1:1 (verde).

Il grafico PCA mostra i cluster distinti formati dai tre campioni indicando che i composti volatili sono nettamente diversi l'uno dall'altro. Come si può vedere in grafico, i tre campioni dove è presente una quantità di frutta a guscio vengono nettamente separati dalla farina con una varianza del 31,2% sull'asse PC2, mentre vengono separati tra loro con una varianza del 37,8% sull'asse PC1.

<sup>6</sup> Termine utilizzato in Statistica per definire, in un insieme di osservazioni un valore chiaramente distante dalle altre osservazioni disponibili.

I campioni dove è presente la noce (NOCE e ARANOCE) presentano un profilo comparabile tra loro (sono nello stesso quadrante negativo PC1). Invece, l'ARACHIDI è nella parte positiva del PC1.

In seguito sono state analizzate le diverse miscele elencate in Tabella 1. Anche in questo grafico PCA i diversi cluster formati per campioni dove sono presenti gli allergeni con diversa composizione, sono stati separati. Come si può vedere dal Grafico B, il sistema separa i contaminanti dalla matrice farina pura, sulla PC1, con una varianza pari al 42%, e sulla PC2 riesce a discriminare tra loro le diverse combinazioni con una varianza dell'11%. Questa discriminazione viene messa ulteriormente in luce, se viene eseguita l'analisi statistica solo per i campioni contaminanti (Grafico C).

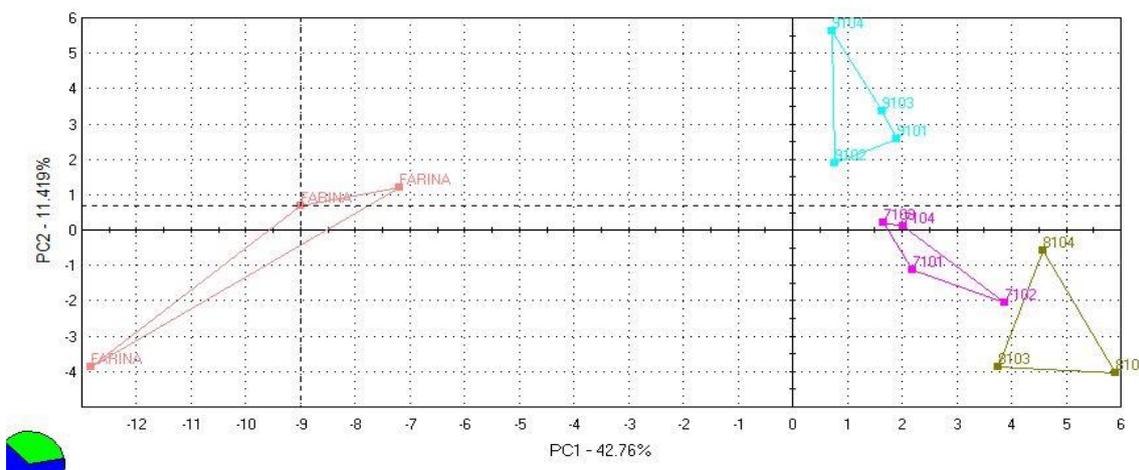


Grafico B - Rappresentazione grafica bidimensionale dell'analisi PCA del profilo dei composti volatili di farina (rosa), noce 10 mg + arachide 90 mg (azzurro), noce 50 mg + arachide 50 mg (viola), noce 90 mg + arachide 10 mg (marrone).

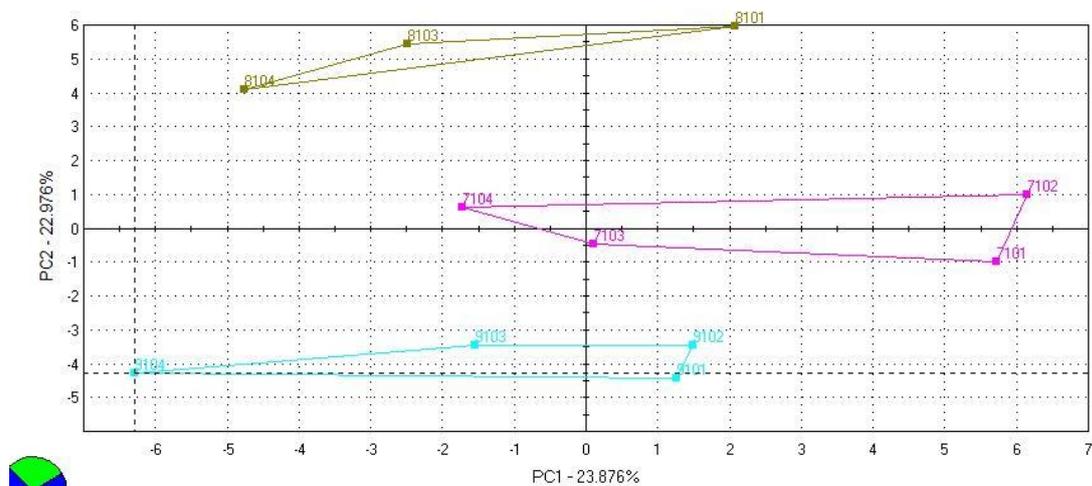


Grafico C - Rappresentazione grafica bidimensionale dell'analisi PCA del profilo dei composti volatili: noce 10 mg + arachide 90 mg (azzurro), noce 50 mg + arachide 50 mg (viola), noce 90 mg + arachide 10 mg (marrone).

È interessante notare che i *clusters* vengono anche qui separati tra loro a seconda della composizione di allergeni che si ha in ciascun campione.

Sono state, infine, eseguite alcune analisi per valutare la “sensibilità” del metodo. In questo caso è stata scelta di utilizzare l’arachide come esempio di frutta a guscio poiché come è stato descritto in precedenza è uno degli allergeni vegetali più pericolosi. A tale scopo, sono state preparate 3 miscele contenenti 1 g di farina e diverse quantità di arachide: 100, 10 e 2 mg.

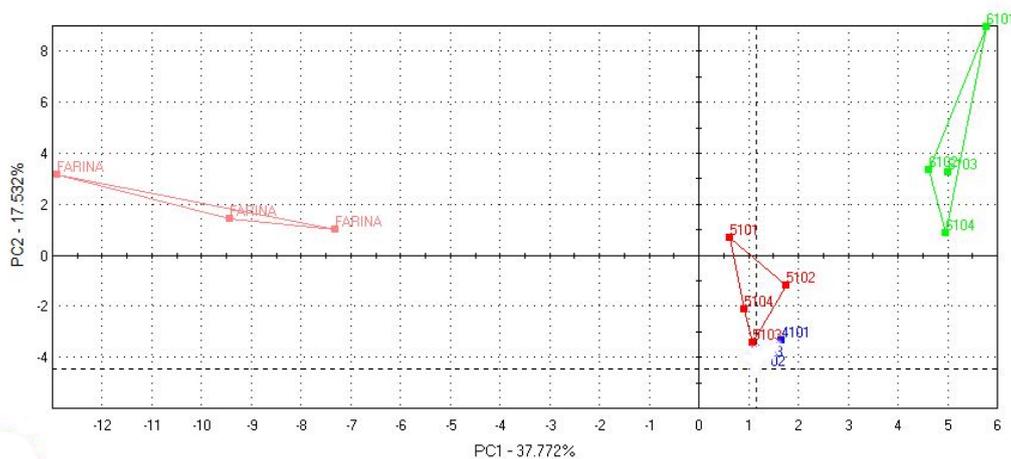


Grafico D - Rappresentazione grafica bidimensionale dell’analisi PCA del profilo dei composti volatili di farina (rosa), arachide 100 mg (azzurro), arachide 10 mg (rosso), arachide 2 mg (verde).

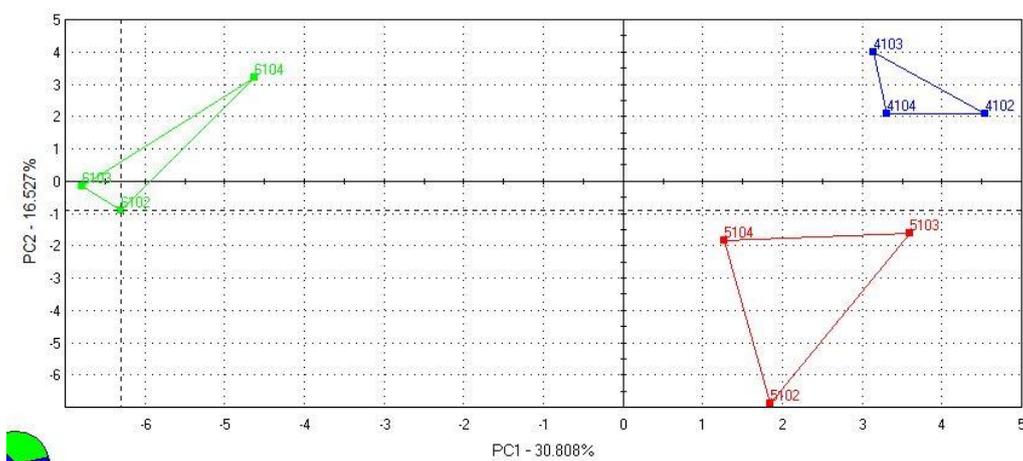


Grafico E - Rappresentazione grafica bidimensionale dell’analisi PCA del profilo dei composti volatili di arachide 100 mg (azzurro), arachide 10 mg (rosso), arachide 2 mg (verde).

Come si può vedere dal Grafico D, il sistema è in grado di separare i campioni distinguendo la matrice pura (farina) dal contaminante arachide presente nelle tre diverse quantità. Inoltre, l’analisi PCA distingue perfettamente i tre campioni di arachide tra loro (Grafico E).

Questi risultati indicano che la determinazione dei componenti volatili con HERACLES II consente di individuare la presenza di diversità nelle matrici analizzate.

## 15. Conclusioni

Questo lavoro intende combinare le tecnologie emergenti di biologia molecolare e analisi chimica, al fine di migliorare l'analisi del DNA applicata alla sicurezza e alla qualità degli alimenti. Con la crescente richiesta di controllo degli alimenti dalla fattoria alla tavola, combinare queste due aree può essere la soluzione per eseguire misure di sicurezza e di controllo della qualità degli alimenti in un modo più semplice, veloce e meno costoso e, quindi, fornire strumenti di analisi efficienti all'industria alimentare e all'autorità di controllo alimentare.

Nel presente lavoro di tesi sono state sviluppate delle metodiche per il rilevamento delle specie allergeniche vegetali in matrici alimentari basate sul DNA e sull'analisi *fingerprinting* dei composti volatili. Le matrici analizzate sono state formate in laboratorio attraverso l'aggiunta, ad una base di farina "00" o cioccolato al latte, di una quantità nota di allergeni vegetali (frutta a guscio e semi commestibili). È stato deciso di analizzare allergeni che avevano subito processi di lavorazioni diversi, quali tostatura in forno e macinazione.

Sono stati valutati gli effetti della matrice e della lavorazione degli alimenti sulla rilevazione delle specie presenti nelle matrici alimentari. Il cioccolato è una matrice "difficile" perché vi è presente un elevato contenuto inibitori (principalmente grassi) che possono interferire nelle varie fasi d'analisi del DNA genomico. Tuttavia, sembra non avere un effetto inibitorio nel rivelamento delle specie allergeniche analizzate con la tecnica del DNA *Barcoding* con sequenziamento in Ion Torrent.

I risultati ottenuti da questo studio sono soddisfacenti e le metodiche usate sono dimostrate efficaci nel rivelamento di specie allergeniche vegetali in varie tipologie di matrici alimentari.

In particolare, si è dimostrato che la tecnica del DNA *Barcoding* accoppiata al sequenziamento NGS (Ion Torrent) ha delle possibilità di applicazione in matrici alimentari per l'identificazione di specie allergeniche vegetali, tuttavia, presenta problemi di sensibilità. Questi problemi possono essere dovuti alla fase di amplificazione con il kit commerciale o essere dovuti al filtraggio che viene fatto dal software durante l'allineamento delle sequenze prodotte (reads).

Il limite di sensibilità che è stato possibile raggiungere con la tecnica del DNA *Barcoding* è stato 100 ppm. Sebbene non sia stabilita una dose limite, 100 ppm è un valore ancora troppo alto una volta che studi clinici hanno dimostrato che piccole quantità di questi allergeni possono scatenare delle reazioni avverse che mettono a rischio la vita dei soggetti sensibili.

La tecnica *Real-time* PCR usata per rilevare gli allergeni vegetali nelle matrici alimentari è in grado di identificare tracce minime di DNA (fino a 2 ppm). Questo valore è comparabile con quelli ottenuti con la tecnica ELISA (circa 5 ppm).

Per ultimo, l'analisi del *fingerprinting* dei composti volatili eseguito con tecnica untarget ed analizzato con la statistica multivariata sembra mostrare una buona potenzialità come possibile analisi di screening della presenza di specie allergeniche vegetali contaminanti nei prodotti alimentari. Ovviamente, essendo queste solo alcune prove esplorative di fattibilità del metodo, per poter concludere che questo tipo di approccio sia adeguato alle sfide che la sicurezza alimentare pone sono necessari ulteriori studi. L'elaborazione chemiometrica usata ha dato buoni risultati su matrici diverse (farina pura vs farina contaminata con l'allergene noce e arachide). L'utilizzo del gascromatografo HERACLES II ha dimostrato che è possibile analizzare e discriminare i composti volatili caratteristici degli aromi, gusti e sapori degli alimenti allergenici vegetali studiati in questo lavoro di tesi.

Queste metodiche potrebbero contribuire efficacemente a gestire meglio il rischio di contaminazione degli allergeni vegetali da parte dell'industria alimentare e dei laboratori di controllo qualità, con l'obiettivo di tutelare la salute dei consumatori sensibilizzati ed allergici.

## Bibliografia

- [1] J. M. Igea, «The history of the idea of allergy,» *Allergy*, vol. 68, pp. 966-973, 2013.
- [2] S. Johansson, J. O. Hourihane, J. Bousquet, C. Brujnzeel-Koomen, S. Dreborg, T. Haahtela, M. L. Kowalski, N. Mygind, J. Ring, M. van Cauwenberge e B. Wuthrich, «A revised nomenclature for Allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force,» *Allergy*, vol. 56, pp. 813-824, 2001.
- [3] I. Agache, A. Abdel-Gadir, S. G. Johansson e M. A. Calderón, EAACI Global Atlas of Allergy, Cezmi A. Akdis;Ioana Agache, 2014, pp. 2-3.
- [4] F.-R. Montserrat, S. Miles e P. J. Davis, «Food Allergies: Clinical and Psychosocial Perspectives,» in *Plant Food Allergens*, B. S. Ltd, A cura di, E.N. CLARE MILLS; PETER R. SHEWRY, 2004, pp. 1-23.
- [5] Wesley Burks, «ICON: Food allergy,» *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 129, pp. 906-20, 2012.
- [6] R. Valenta, H. Houchwallner, B. Linhart e S. Pahr, «Food Allergies: The Basics,» *Gastroenterology*, vol. 148, pp. 1120-1131, 2015.
- [7] J. I. Boye, A. O. Danquah, C. L. Thang e X. Zhao, *Food Biochemistry and Food Processing*, Quebec: Dr. Benjamin K. Simpson, 2012.
- [8] «UNIVERSITY of NEBRASKA–LINCOLN,» [Online]. Available: <https://farrp.unl.edu/reg-sit-food-allergens>. [Consultato il giorno 17 Febbraio 2020].
- [9] M. Prado, I. Ortea, S. Vial, J. Rivas, P. Calo-Mata e J. Barros-Velazquez, «Advanced DNA- and Protein-based Methods for the Detection and Investigation of Food Allergens,» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 56, pp. 2511-2542, 2016.
- [10] M. . H.-K. Ho, W. H.-S. Wong e C. Chang, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, vol. 46, pp. 225-240, 2014.
- [11] E. A. o. A. a. C. I. (EAACI), «Food Allergy & Anaphylaxis Public Declaration,» 2013.
- [12] «EAACI Patients,» [Online]. Available: <https://patients.eaaci.org/>.
- [13] A. Muraro, *Tackling the Allergy Crisis in Europe -Concerted Policy Action Needed*, 2014.
- [14] R. S. Gupta, C. M. Warren, B. . M. Smith, . J. Jiang, J. . A. Blumenstock, M. M. Davis, R. . P. Schleimer e K. . C. Nadeau, «Prevalence and Severity of Food Allergies Among US Adults,» *JAMA Network Open*, vol. 2, n. 1, 2019.
- [15] MONTSERRAT, S. MILES, P. R. SHEWRY, J. A. JENKINS e F. BEAUDOIN, *Plant Food Allergens*, B. S. Ltd, A cura di, E.N. CLARE MILLS; PETER R. SHEWRY, 2004, pp. 1-23.

- [16] M. Volpicella, C. Leoni, M. C. Dileo e L. R. Ceci, «Progress in the Analysis of Food Allergens through Molecular Biology Approaches,» *Cells*, vol. 8, n. 1073, pp. 1-14.
- [17] H. Dalley, «The Chemistry of Allergies,» *Bridgewater Review*, vol. 13, n. 1, pp. 7-9, 1994.
- [18] H. . A. Sampson, L. O'Mahony, A. W. Burks, M. Plaut, G. Lack e C. A. Akdis, «Mechanisms of food allergy,» *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 141, n. 1, pp. 11-18, 2018.
- [19] P. Satitsuksanoa, K. Jansen, A. Głobinska, W. van de Veen e M. Akdis, «Regulatory Immune Mechanisms in Tolerance to Food Allergy,» *Frontiers in Immunology*, vol. 9, n. 2939, pp. 1-9, 2018.
- [20] D. B. Corry e F. Kheradmand, «Induction and regulation of the IgE response,» *Nature*, vol. 402, pp. 18-23, 1999.
- [21] I. Agache, A. Abdel-Gadir, S. G. Johansson e M. A. Calderón, EAACI Global Atlas of Allergy, Cezmi A. Akdis;Ioana Agache, 2014, pp. 2-3.
- [22] «EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2014. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes,» *EFSA Journal*, p. 277, 2014.
- [23] «EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2014. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes.,» European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, 2014.
- [24] A. Perino, *Allergia e Intolleranza Alimentare*, Seconda Edizione a cura di, Torino: Pacini Editore S.p.A, 2001.
- [25] «Associazione Italiana Celiachia,» [Online]. Available: <https://www.celiachia.it/>. [Consultato il giorno 08 01 2020].
- [26] E. A. Roland Ernest Poms, «Effects of Chemical , Physical, and Technolglcal Process on the Nature of Food Allergens,» *Journal of AOAC International*, vol. 87, n. 6, 2004.
- [27] H. Breiteneder, «ALLERGEN FAMILIES AND DATABASES,» in *MOLECULAR ALLERGOLOGY : USER'S GUIDE*, Paolo Maria Matricardi, Jörg Kleine-Tebbe, Hans Jürgen Hoffmann, Rudolf Valenta, Markus Ollert, 2016, pp. 57-67.
- [28] P. R. SHEWRY e A. S. TATHAM, «The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution,» *Biochemical Journal*, vol. 267, pp. 1-12, 1990.
- [29] F. J. Moreno e A. Clemente, «2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens?,» *The Open Biochemistry Journal*, vol. 2, pp. 16-28, 2008.
- [30] H. Breiteneder e C. Radauer, «A classification of plant food allergens,» *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, pp. 821-830, 2004.
- [31] M. Hauser, M. Egger, M. Wallner, N. Wopfner, G. Schmidt e F. Ferreira, «Molecular Properties of Plant Food Allergens: A Current Classification into Protein Families,» *The Open Immunology Journal*, vol. 1, pp. 1-12, 2008.

- [32] N. Hernández-Espinosa, . M. Reyes-Reyes, F. E. González-Jiménez, . L. C. Núñez-Bretón e B. L. Cooper-Bribiesca, «Importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales (prolaminas),» © *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, vol. 18, n. 1, pp. 3-7, 2015.
- [33] S. KUMAR, A. K. VERMA, M. DAS e P. D. DWIVEDI, «Allergenic Diversity among Plant and Animal Food Proteins,» *Food Reviews International*, vol. 28, pp. 277-298, 2012.
- [34] «Allergen Online,» [Online]. [Consultato il giorno 27 01 2020].
- [35] E. Untersmayr e E. Jensen-Jarolim, «The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes,» *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 121, n. 6, pp. 1301-1310, 2008.
- [36] F. Altmann, «The Role of Protein Glycosylation in Allergy,» *International Archives of Allergy and Immunology*, vol. 142, p. 99–115, 2007.
- [37] Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects, Cesarettin Alasalvar; Fereidoon Shahidi, 2009.
- [38] Clare Mills, *Impact of Food Processing on the Structural and Allergenic Properties of Food Allergens*, pp. 1-16.
- [39] J.-M. Wal, «Thermal processing and allergenicity of foods,» *Allergy*, vol. 58, p. 727–729, 2003.
- [40] F.-D. Popescu, «Cross-reactivity between aeroallergens and food allergens,» *World Journal of Methodology*, vol. 5, n. 2, pp. 31-50, 26 June 2015.
- [41] T. Weinberger e S. Sicherer, «Current perspectives on tree nut allergy: a review,» *Journal of Asthma and Allergy*, vol. 11, pp. 41-51, 2018.
- [42] O. STEPHAN e S. VIETHS, «Development of a Real-Time PCR and a Sandwich ELISA for Detection of Potentially Allergenic Trace Amounts of Peanut (*Arachis hypogaea*) in Processed Foods,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, p. 3754–3760, 2004.
- [43] «REGOLAMENTO (UE) N. 1169/2011 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 25 ottobre 2011,» 2011.
- [44] «Food allergen labelling and information requirements under the EU Food Information for Consumers Regulation No. 1169/2011: Technical Guidance,» 2015.
- [45] J. M. S. & L. Manning, «“May Contain” Allergen Statements: Facilitating or Frustrating Consumers?,» *Journal of Consumer Policy*, vol. 40, pp. 447-472, 2017.
- [46] S. de la Cruz, I. López-Calleja, R. Martín, I. González, M. Alcocer e T. García, «Recent Advances in the Detection of Allergens in Foods,» in *Food Allergens: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1592, Jing Lin; Marcos Alcocer, 2017, pp. 263-295.
- [47] R. Baker, «The Global Status of Food Allergen Labeling Laws,» *California Western Law Review*, vol. 54, n. 2, 2018.
- [48] M. Planque, T. Arnould e N. Gillard, «Food Allergen Analysis: Detection, Quantification and Validation by Mass Spectrometry,» *INTECH OPEN*, 2017, pp. 7-41.

- [49] Governo Italiano, «Ministero della Salute,» [Online]. Available: [http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?id=1146&area=sicurezzaAlimentare&menu=sistema](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=1146&area=sicurezzaAlimentare&menu=sistema). [Consultato il giorno 30 01 2020].
- [50] I. M. López-Calleja, S. de la Cruz, I. González, T. García e R. Martín, «Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR,» *Food Chemistry*, vol. 177, pp. 111-119, 2015.
- [51] J. Frigerio, R. Pellesi, V. Mezzasalma, F. De Mattia, A. Galimberti, F. Lambertini, M. Suman, S. Zanardi, A. Leporati e M. L., «Development of a DNA Barcoding-Like Approach to Detect Mustard Allergens in Wheat Flours,» *Genes*, vol. 234, pp. 1-11, 2019.
- [52] D. Croote e S. R. Quake, «Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology,» *Systems Biology and Applications*, n. 16022, 2016.
- [53] R. Linacero, A. Sanchiz, I. Ballesteros e C. Cuadrado, «Application of real-time PCR for tree nut allergen detection in processed foods,» *CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION*, pp. 1-17, 2019.
- [54] «<https://www.khanacademy.org/>,» [Online].
- [55] L. A. Pray, «Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick,» *Nature Education*, vol. 1, n. (1):100, 2008.
- [56] D. Rodríguez-Lázaro e M. Hernández, «Real-time PCR in Food Science: Introduction,» *Current issues in molecular biology*, vol. 15, pp. 25-38, March 2013.
- [57] M. J. Walker, D. T. Burns, C. T. Elliott, M. H. Gowland e E. N. C. Mills, «Is food allergen analysis flawed? Health and supply chain risks and a proposed framework to address urgent analytical needs,» *Analyst*, vol. 141, n. 24, 2016.
- [58] A. I. Dragan, J. R. Casas-Finet, E. S. Bishop, R. J. Strouse, M. A. Schenerman e C. D. Geddes, «Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding,» *Biophysical Journal*, vol. 99, pp. 3010-3019, 2010.
- [59] M. A. Valasek e J. J. Repa, «The power of real-time PCR,» *Advances in Physiology Education*, vol. 29, pp. 151-159, 2005.
- [60] V. L. Singer, L. J. Jones, S. T. Yue e R. P. Haugland, «Characterization of PicoGreen Reagent and Development of Fluorescence-Based Silution Assay for Double-Stranded DNA Quantification,» *Analytical Biochemistry*, n. 249, pp. 228-238, 1997.
- [61] A. I. Dragan, R. Pavlovic, J. B. McGivney, J. R. Casas-Finet, E. S. Bishop, R. J. Strouse, M. A. Schenerman e C. D. Geddes, «SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA,» *Journal of Fluorescence*, vol. 22, n. 4, pp. 1189-1199, 2012.
- [62] P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball e J. R. deWaard, «Biologic identifications through DNA barcodes,» *The Royal Society*, vol. 270, pp. 313-321, 2003.
- [63] A. Galimberti, F. D. Matti, A. Losa, I. Bruni, S. Federici, M. Casiraghi, S. Martellos e M. Labra, «DNA barcoding as a new tool for food traceability,» *Food Research International*, vol. 50, pp. 55-63, 2013.

- [64] B. Merriman e J. M. Rothberg, «Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing,» *Electrophoresis*, vol. 33, pp. 3397-3417, 2012.
- [65] *DECRETO LEGISLATIVO 3 aprile 2006, n. 152 - Norme in materia ambientale*, p. 709.
- [66] «Alpha MOS,» 20 01 2020. [Online]. Available: <https://www.alpha-mos.com/>.
- [67] A. Quarantelli , F. Righi , M. Renzi e A. Bonomi , «PROCESSI OSSIDATIVI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE,» *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma* , vol. XXIII, pp. 181-202, 2003.
- [68] *HERACLES Electronic Nose - Technical Specifications*. [Performance].
- [69] QIAGEN® , *DNeasy® mericon® Food Handbook*, 2014, pp. 1-30.
- [70] Thermo Fisher Scientific Inc, «Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements,» 2018.
- [71] SGS - Thermo Fisher Scientific, «All Species ID,» 2018. [Online]. Available: <https://www.foodprocessing-technology.com/products/all-species-id/>.
- [72] Thermo Fisher Scientific, [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/it/en/home.html>. [Consultato il giorno 03 02 2020].
- [73] «Bioinformatics Lessons at your convenience,» [Online]. Available: <https://binf.snipcademy.com/lessons/ngs-techniques/emulsion-pcr>. [Consultato il giorno 05 02 2020].
- [74] Ion Torrent by Life Technologies™ , *Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2*, 2013.
- [75] M. Filippini, *Analisi qualitative e quantitative basate sul DNA per l'identificazione di allergeni vegetali in matrici alimentari*, 2018-2019.

