

Allergeni: analisi, strumenti e accreditamento dei laboratori

a cura di **Debora De Santis**
Giornalista

Intervista
a Giancarlo Peruzzo
ed Emiliano Santoro
del Dipartimento Laboratori
di Prova di Accredia

54

L'analisi e il controllo degli allergeni presenti negli alimenti viene condotta nei laboratori con metodiche specifiche e strumentazioni ad hoc. Abbiamo intervistato Giancarlo Peruzzo ed Emiliano Santoro del Dipartimento Laboratori di Prova di Accredia, l'ente italiano di accreditamento preposto alla verifica della competenza e imparzialità degli organismi di certificazione e dei laboratori accreditati.

• Quali sono i riferimenti normativi che impegnano gli operatori del settore alimentare a dichiarare in etichetta la presenza di allergeni in alimenti e bevande?

La normativa vigente nell'Unione europea in tema di allergeni alimentari è il regolamento (UE) 1169/2011 sulle informazioni da dare ai consumatori su alimenti e bevande. In particolare,



Giancarlo Peruzzo ed Emiliano Santoro del Dipartimento Laboratori di Prova di Accredia

l'allegato II riporta l'elenco degli allergeni che devono essere inseriti in etichetta, ad esempio, glutine, crostacei, uova o sedano. Il regolamento, all'articolo 9, paragrafo 1, lettera c, stabilisce l'obbligo di riportare «qualsiasi ingrediente o coadiuvante tecnologico che provochi allergie o intolleranze usato nella fabbricazione o nella preparazione di un alimento e ancora presente nel prodotto finito, anche se in forma alterata». È obbligatorio fornire queste informazioni anche per gli alimenti non pre-imballati, come quelli sfusi o i piatti serviti nella ristorazione collettiva.

L'articolo 21, al paragrafo 1, indica i requisiti da rispettare per le indicazioni relative agli allergeni. Devono comparire nell'elenco degli ingredienti con un riferimento chiaro alla denominazione della sostanza o del prodotto, che deve essere evidenziata con un tipo di carattere chiaramente distinto da quello usato per gli ingredienti elencati,

ad esempio per dimensioni, stile o colore di sfondo. In mancanza di un elenco degli ingredienti, le indicazioni di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera c), includono il termine "contiene", seguito dalla denominazione della sostanza o del prodotto

figurante nell'elenco dell'allegato II. Quando più ingredienti o coadiuvanti tecnologici di un alimento provengono da un'unica sostanza o da un unico prodotto figurante nell'elenco dell'allegato II, ciò è precisato nell'etichettatura per ciascun ingrediente o coadiuvante tecnologico in questione. Nei casi in cui la denominazione dell'alimento fa chiaramente riferimento alla sostanza o al prodotto in questione, le indicazioni di cui all'articolo 9, paragrafo 1, lettera c), non sono richieste.

• **Quali sono le tecniche di analisi più affidabili per rilevare gli allergeni in alimenti, bevande e superfici, anche al fine di evitare la contaminazione crociata? Quali sono le applicazioni, i punti di forza e le criticità di ognuna?**

Le tecniche analitiche più utilizzate per la determinazione degli allergeni negli alimenti sono ELISA, RT-PCR, LC-MS/MS.

ELISA, ossia Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay,

I Laboratori Nazionali di Riferimento dell'Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Dermatiti eseguono l'analisi della contropertinza

è probabilmente la tecnica più utilizzata per effettuare nella routine la determinazione degli allergeni negli alimenti. Con questa metodica è possibile individuare direttamente la proteina allergenica, utilizzando anticorpi specifici che formano un complesso stabile con il determinante allergenico, e ottenere un risultato quantitativo con un grado elevato di accuratezza e sensibilità. Si segnala l'importanza di valutare la reattività e la prestazione dei kit ELISA in commercio, soprattutto in caso di analisi di cibi altamente trasformati. In questi casi, infatti, l'eventuale denaturazione, aggregazione e allergenicità della proteina possono essere influenzate da più variabili, compreso lo stress termico subito durante i processi di produzione.



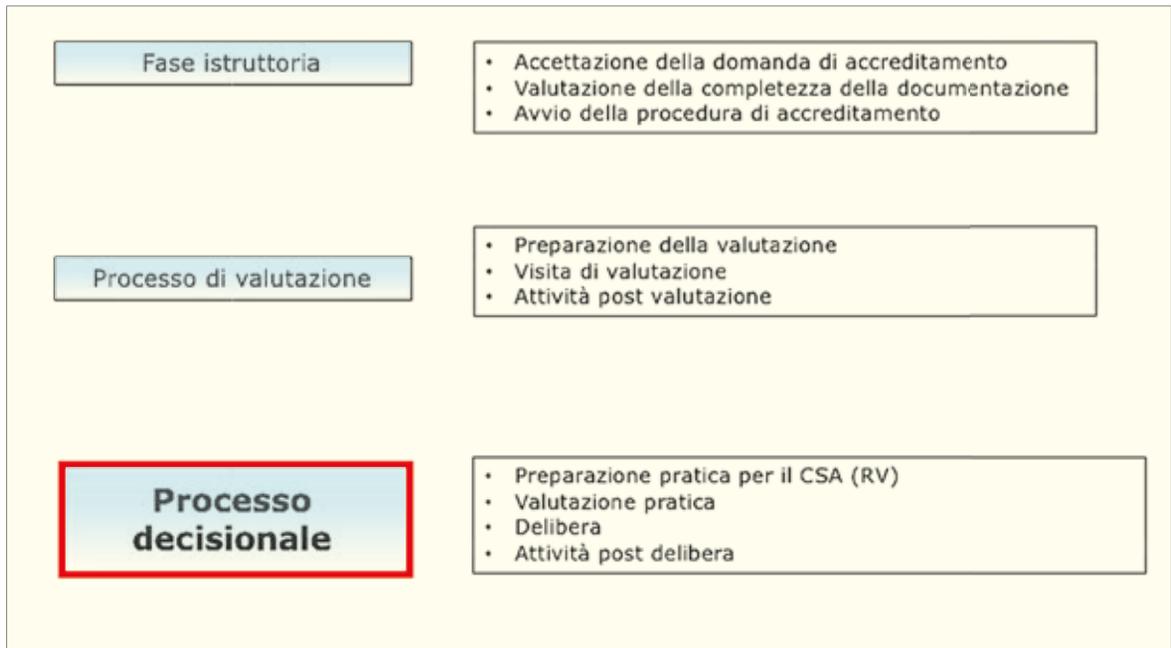


Figura 1 – Come si svolge l’accreditamento

PCR, ossia Real-Time Polymerase Chain Reaction, è una tecnica con la quale si determina la presenza del dna della “specie” da cui la proteina è generata. Si tratta di un metodo piuttosto sensibile, che consiste nell’amplificazione del dna mediante l’utilizzo di primer specifici. Con questa metodica, i frammenti di dna amplificati vengono rilevati e quantificati.

Molto utile anche la tecnica LC-MS/MS, ossia Liquid Chromatography and Mass Spectrometry, sempre più utilizzata, che combina l’elevato potere risolutivo della Cromatografia Liquida (LC) con la specificità e la sensibilità della Spettrometria di Massa (MS/MS). Con queste metodiche, enzimi specifici generano peptidi più semplici dalle proteine allergeniche. La cromatografia liquida isola i peptidi target dalla matrice alimentare, mentre la spettrometria di massa li identifica e li

quantifica. In questo modo, gli allergeni possono essere quantificati direttamente, a prescindere dalla loro conformazione. La tecnica LC-MS/MS è particolarmente affidabile per determinare la presenza di allergeni alimentari nei cibi altamente trasformati.

• Quali materiali di riferimento sono oggi disponibili sul mercato per l’analisi degli allergeni? Qual è la loro funzione? Ritenete siano importanti per garantire l’affidabilità delle analisi svolte e, se sì, per quali tipologie di analisi?

Abbiamo a disposizione materiali con un contenuto noto di allergene disperso in una matrice alimentare: sono dotazioni che i laboratori possono utilizzare come controlli di processo e/o nelle attività interne di valutazione delle prestazioni analitiche, al fine di assicurare la validità dei risultati e le attività di validazione/verifica di corretta applicazione dei metodi.

In generale, è importante che il materiale di riferimento sia tracciabile, sufficientemente stabile e omogeneo. L’esigenza di garantire la qualità delle

ELISA è la tecnica più utilizzata per effettuare nella routine la determinazione degli allergeni negli alimenti

misurazioni e la riferibilità dei risultati al sistema internazionale delle unità di misura ha introdotto il ricorso all'accreditamento, cioè l'attestazione di competenza dei produttori di materiali di riferimento come valutazione della conformità. Per questo, i materiali di riferimento certificati immessi da produttori accreditati ai sensi della norma ISO 17034 (Reference Material Producers- RMP) garantiscono la riferibilità.

• Quali sono le tipologie di strumenti oggi presenti sul mercato per rilevare la presenza di allergeni? Quali sono le tipologie più indicate, a seconda dell'uso? Quali tra queste possono essere utilizzate in autonomia dall'operatore del settore alimentare e quali invece esclusivamente dai laboratori?

Nei laboratori di prova troviamo sistemi di analisi ELISA con lettori di micropiastre (strumenti usati per la lettura di micropiastre nell'ambito dei test ELISA), sistemi LC-MS/MS (HPLC accoppiata alla spettrometria di massa), sistemi PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction): si tratta di dotazioni

che richiedono un controllo attento dei flussi operativi e delle condizioni ambientali, pertanto le analisi devono essere condotte in laboratorio da personale formato e abilitato a eseguire i test previsti.

Sono disponibili diverse tipologie di test rapidi, come i test a flusso laterale (Lateral Flow Test o Lateral Flow Immunochromatography), più veloci e più facili da utilizzare rispetto ad altre metodiche. In questi test, il campione liquido scorre su un supporto verso un'area in cui sono immobilizzate sostanze specifiche (ad esempio, anticorpi) che generano una reazione e, quindi, un segnale (generalmente la comparsa di colore).

Ovviamente, per migliorare le prestazioni e la sensibilità delle determinazioni sarà necessario ricorrere ai test più complessi descritti precedentemente, eseguiti nei laboratori.

• Quanti sono, ad oggi, i laboratori accreditati da Accredia per la determinazione degli allergeni?

Attualmente, in Italia, ci sono 70 laboratori di prova accreditati secondo la norma di riferimento



Sono disponibili diverse tipologie di test rapidi, come i test a flusso laterale, più veloci e più facili da utilizzare

UNI CEI EN ISO/IEC 17025, con almeno una prova accreditata per la determinazione degli allergeni. Le prove sono accreditate per l'85% in campo fisso e il 15% in campo flessibile. Il campo di accreditamento, infatti, può essere descritto in modo fisso o flessibile. Si parla di campo fisso quando la descrizione dello scopo di accreditamento dettaglia completamente la prova, con l'indicazione di matrici/prodotti, parametri, metodi di prova. Nel caso di campo flessibile, invece, la descrizione dello scopo è più generica e ammette la possibilità, da parte del laboratorio, di estendere lo scopo

di accreditamento inserendo metodi basati sulle stesse tecniche di quelli già accreditati. Questo può avvenire sulla base di competenze possedute e già valutate positivamente per l'accREDITAMENTO.

• Se un laboratorio non è accreditato Accredia, può comunque svolgere analisi sugli allergeni negli alimenti o i risultati ottenuti non sono validi?

Un laboratorio non accreditato da Accredia può in ogni caso svolgere analisi sugli allergeni in alimenti, se il proprio cliente non ha interesse a ricevere il rapporto di prova con il marchio Accredia.

L'accREDITAMENTO non comporta comunque una diminuzione delle responsabilità associate alle attività svolte dai laboratori di prova, poiché questi rimangono gli unici soggetti responsabili nei confronti dei terzi per tutta l'attività svolta dagli stessi.





In Italia, ci sono
70 laboratori di prova
con almeno
una prova accreditata
per la determinazione
degli allergeni

©www.shutterstock.com

59

- **Quali sono le principali prove analitiche per cui è stato richiesto l'accreditamento?**

Attualmente le principali metodiche analitiche accreditate dal laboratorio sono la Immunoenzimatica ELISA e la PCR-Real Time. Per ridurre il rischio di presenza di allergeni negli alimenti, è consigliabile combinare insieme le tecniche RT PCR ed ELISA, in quanto forniscono risultati complementari.

- **Come avviene l'accreditamento e quali controlli vengono effettuati sui laboratori accreditati?**

Il processo parte dalla ricezione da parte di Accredia della "domanda di accreditamento" e si articola in una serie di fasi. Si valuta la completezza della domanda di accreditamento, si individua un team ispettivo, generalmente costituito da un ispettore di sistema e da uno o più ispettori tecnici, in funzione della tipologia di prove da accreditare.

Il team procede all'esame approfondito dei documenti, dalla domanda di accreditamento al manuale del sistema di gestione della qualità, dall'organigramma delle funzioni del laboratorio all'elenco dei criteri adottati per la valutazione dell'incertezza di misura agli eventuali metodi di prova "interni".

Nella fase di post audit, i rilievi e le eventuali riserve vengono valutati dalla Direzione del Dipartimento Laboratori di prova di Accredia e, in seguito ai controlli e alle verifiche effettuati sui dossier dal Comitato settoriale di accreditamento (CSA) di Accredia, che produce un ulteriore rapporto di valutazione, il processo si conclude.

L'accreditamento e la relativa convenzione (contratto) hanno una validità di quattro anni, a partire dalla data di delibera del comitato. Di prassi, seguono una prima visita di sorveglianza, dopo sei mesi dalla concessione del primo accreditamento, e successive visite annuali. Al termine di ogni ciclo quadriennale, il laboratorio può chiedere il rinnovo dell'accreditamento.