



Answers for Science.
Knowledge for Life.™

It's Time to
See the Future
Differently

Allergen Detection in Wine by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Samuele Scurati

9 Maggio 2017



Chiarificazione del vino

- Chiarificazione:
processo per rendere limpido e rimuovere i sedimenti del vino



Come si chiarifica il vino

- I chiarificanti sono materiali utilizzati per rendere limpido e rimuovere i sedimenti del vino
- Esistono chiarificanti di origine
 - non animale (Bentonite, Silice)
 - animale (albumina d'uovo, caseina)
- Chiarificanti di origine animale non possono essere usati nei vini vegani
- Nel 2011 l'EFSA stabilisce che i vini chiarificati per mezzo di proteine animali possono causare reazioni allergiche



Perchè le allergie da alimenti sono così importanti?

- Ne soffrono circa 150 Milioni di persone al mondo
- Cosa sono gli allergeni?
 - Miscele complessa di composti chimici, incluse **proteine** e solfiti, che possono provocare risposte avverse da parte dell'organismo.
- La cura?
 - Non c'è! L'unica soluzione è evitare il consumo di allergeni.



Per questo motivo, una etichettatura accurata per gli allergeni sugli alimenti è di grossa importanza!!

Etichettatura degli alimenti



Cos'è l'ETICHETTA?

"È qualunque marchio commerciale o di fabbrica, segno, immagine o altra rappresentazione grafica scritta, stampata, stampigliata, marchiata, impresso in rilievo o a ingrandimento sull'imballaggio o sul contenitore di un alimento o che accompagna tale imballaggio o contenitore." (Art. 1 Reg. 1169/2011)

Etichettatura dei vini

OBBLIGO DI INDICARE GLI ALLERGENI IN ETICHETTA
DAL 1° LUGLIO 2012 COSÌ COME DISPOSTO DAL REG. 609 DEL 29 GIUGNO 2012 È SCATTATO L'OBBLIGO DI INDICARE IN ETICHETTA L'IMPRESO DEI DERIVATI DELL'UOVO (ALBUMINA) E DEL LATTE (CASSINA)
LE INDICAZIONI CONVENIENTI SONO:
- "CONTIENE SOLFITI" OPPURE "CONTIENE ANIDRIDE SOLFOROSA"
- "CONTIENE UOVO", OPPURE "CONTIENE PROTEINE DELL'UOVO", "CONTIENE DERIVATI DELL'UOVO",
"CONTIENE LIGANDI DA UOVO O DI OVALBUMINA"
- "CONTIENE LATTE", OPPURE "CONTIENE DERIVATI DEL LATTE", "CONTIENE CASERNA DEL LATTE", "CONTIENE PROTEINE DEL LATTE".
IL LOGO COMUNITARIO RELATIVO TRA QUELLI SOTTOELENCATI

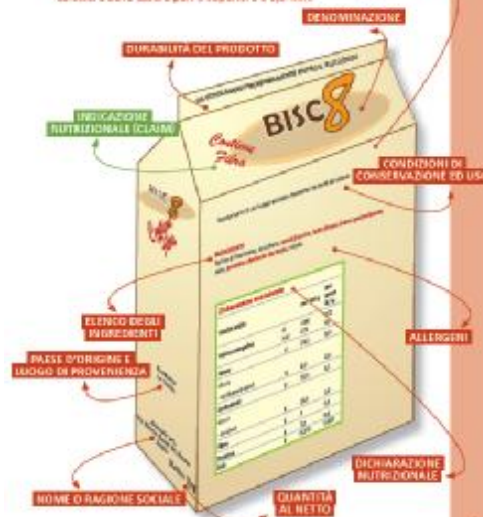


Answers for Science.
Knowledge for Life.

5

Leggibilità delle informazioni

Tutte le indicazioni devono essere stampate in modo chiaro e leggibile in carattere pari o superiore a 1,2 mm. Nelle confezioni più piccole il carattere deve essere pari o superiore a 0,9 mm.

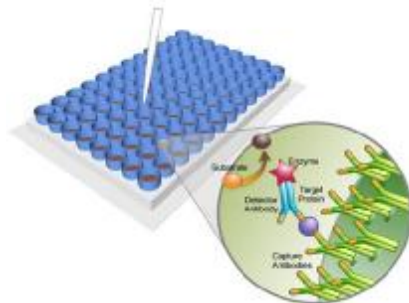
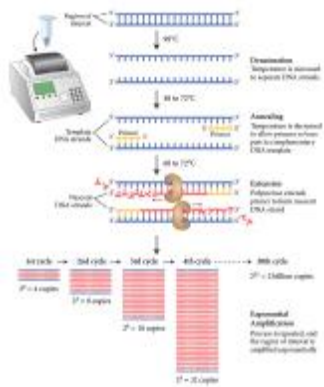


CONFIDENTIAL & PROPRIETARY © 2017 AB Sciex

Come si stabilisce la presenza di Allergene?

PCR — Identifica la presenza del gene che codifica per l'allergene

ELISA — Identifica la presenza della proteina



Answers for Science.
Knowledge for Life.

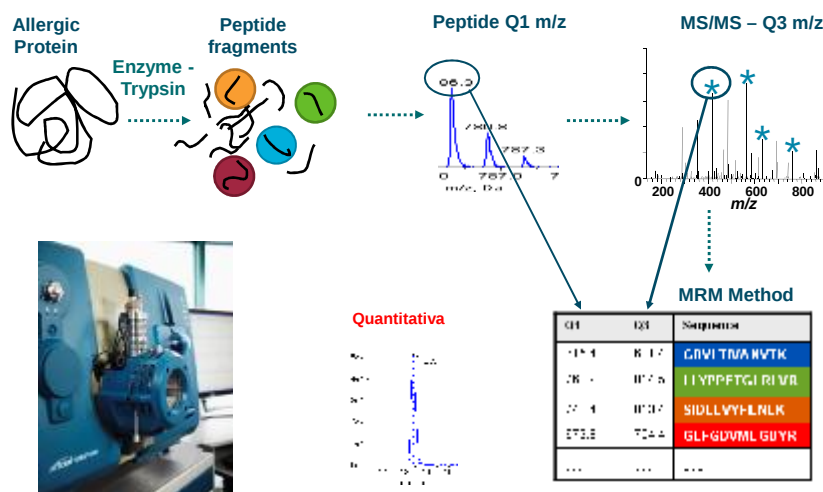
6

CONFIDENTIAL & PROPRIETARY © 2017 AB Sciex

ELISA & PCR per l'identificazione di allergeni

Parameter	PCR	ELISA
Allergen detection approach	DNA of allergen is amplified and detected	Allergenic protein reacts to an antibody
Lowest limit of detection	Several molecules (as few as 10, in theory)	Low part-per-million (ppm), depending on the allergen
Number of allergens per analysis	> 2	1
Effects of food processing	Acidic food processing could destroy detectable DNA (false negative results)	Cooking or other processing could denature or modify proteins, causing inability to detect them (false negative results)
Specificity	Highly specific	Some allergen cross-reactivity possible
Sample preparation	Slightly laborious	Easy and fast
Matrix influence	Matrix can inhibit PCR and cause significant interferences (false negative results)	Potential interference from other allergenic proteins in the sample (false negative and false positive results)
Analysis time	2 to 6 hours	0.5 to 3 hours
Disadvantages	- Milk and egg allergens can not be detected - High susceptibility to matrix interferences	- Analysis of only one allergen at a time - High susceptibility for cross-reactivity (false positive and negative results)
Advantages	- Potentially very sensitive to low levels of allergens - Highly specific to each unique allergen - Can identify multiple allergens in a single analysis	- Fast, easy, and inexpensive - Ability to analyze ingredients during food processing stages very quickly

Approccio LC-MS/MS per analisi allergeni



Scelta dei giusti peptidi degli allergeni

Il peptide scelto:

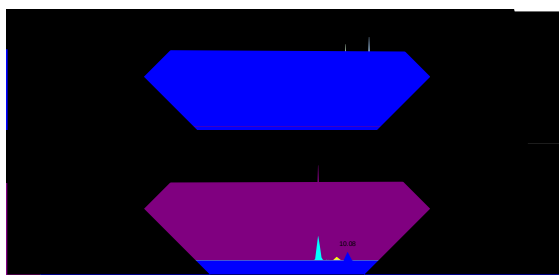
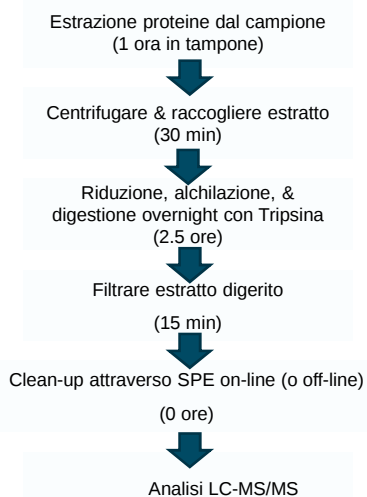
- deve essere unico per la proteina dell'allergene
 - Ricerca su database di proteine
- non deve subire modificazioni nel food processing
 - Es. Peptidi che non contengono Metionina
- non deve essere modificato dalla reazione di Maillard
 - Reazione tra amminoacidi e zuccheri durante la cottura dei cibi

In una singola corsa è possibile analizzare diversi peptidi

- Dello stesso allergene
- Di allergeni diversi



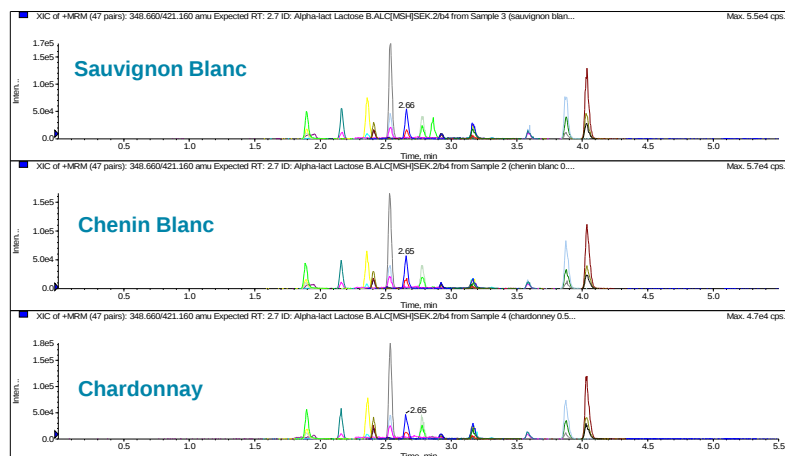
Preparazione del campione e screening multi-allergene



Multiple allergenic peptides monitored in a single analysis.

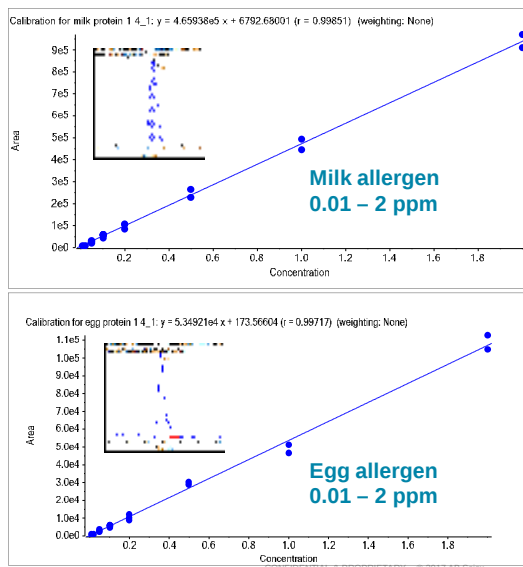
(Rapid Commun. Mass Spectrom. (2008), 22, 807-811., Careri et al)

Analisi Quantitativa di allergeni di latte e uova nel vino

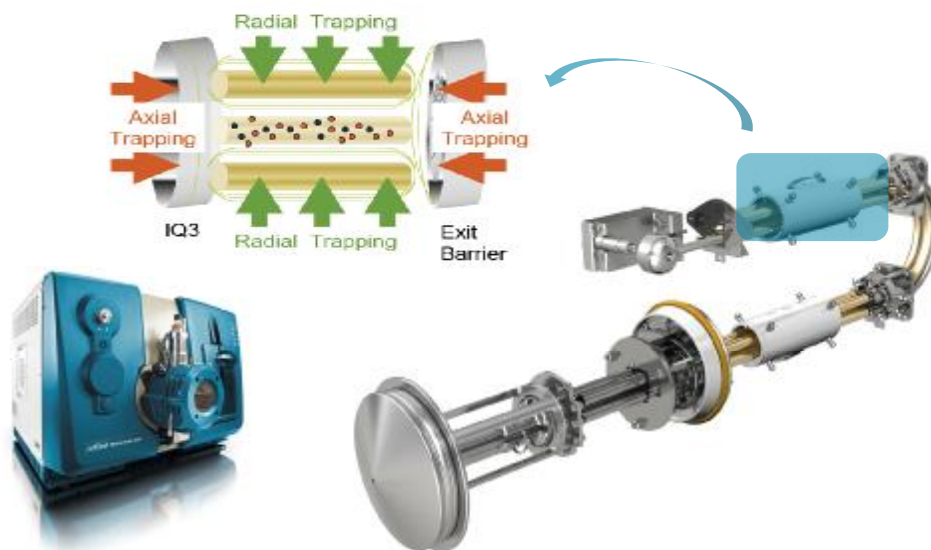


Analisi Quantitativa di allergeni di latte e uova nel vino

- La LC-MS/MS garantisce un approccio robusto, sensibile e specifico per la determinazione di questi allergeni



Tecnologia QTRAP

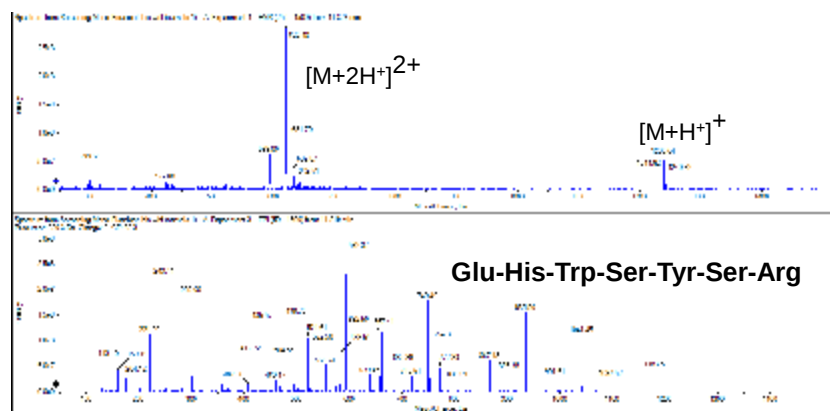


SCIEX Answers for Science. Knowledge for Life.™

13

CONFIDENTIAL & PROPRIETARY © 2017 AB Sciex

MRM e spettro full MS/MS



Conferma dello spettro MS/MS dal confronto con database

SCIEX Answers for Science. Knowledge for Life.™

14

CONFIDENTIAL & PROPRIETARY © 2017 AB Sciex

Test LC-MS/MS & ELISA per allergeni

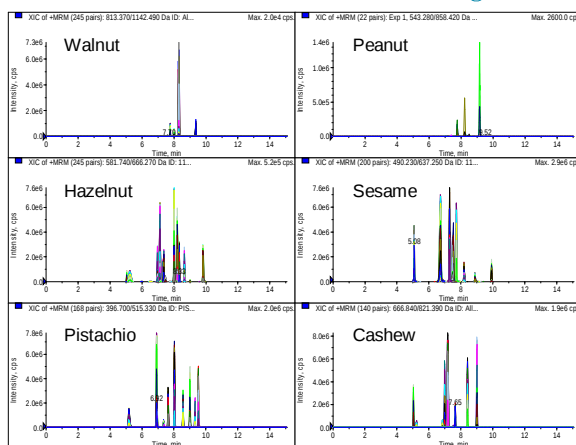
	ELISA	LC-MS/MS
Detection approach	antibody / protein interaction	Detection of multiple peptide markers per species
Sensitivity	5-10 ppm	0.1-5 ppm*
Time requirements	2 hours sample to results	4 hours sample to results
Labor requirements	Low	Medium
Selectivity	Single point of confirmation	Multiple points of confirmation
False result risk level	Medium to High	Low

LC-MS/MS più laboriosa rispetto ai Kit ELISA,
ma fornisce un livello di sensibilità e specificità maggiori

Allergeni di Noci

- La classe è molto ampia

- Alberi da noci
(pistacchio, noci, nocciole,
anacardio, noci brasiliane,
nocciolo americano, ecc..)
- Arachidi
- Sesamo



La ricerca di peptidi multipli per ogni allergene assicura una
identificazione sicura anche nel caso di cottura o lavorazione del cibo

Glutine

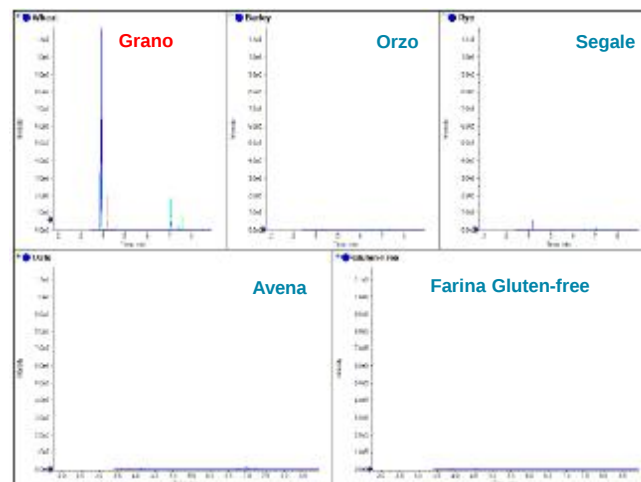
- Il glutine è una classe di lipoprotine che si trova in **grano, orzo, segale e avena**
- Il glutine non rappresenta un'unica classe di proteine, bensì varia tra le specie:

- Avena = Avenina
- Grano = Gliadina & Glutenina
- Orzo = Ordeina
- Segale = Secalina



Markers peptidici specifici: Grano

Per ogni tipo di cereale vengono ricercati peptidi specifici per il tipo di glutine



Markers peptidici specifici: Avena

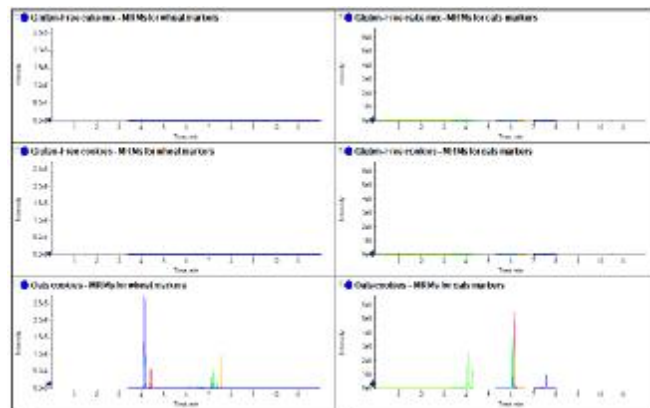
Per ogni tipo di cereale vengono ricercati peptidi specifici per il tipo di glutine



Performance del metodo su prodotti commerciali

Peptidi del grano

Peptidi di Avena



**Gluten-free
Torta**



**Gluten-free
Biscotti**



**Biscotti
Avena**



Possibile identificare contaminazioni o frodi alimentari



SCIEX
Answers for Science.
Knowledge for Life.™

It's Time to
See the Future
Differently

Grazie per l'attenzione