





# LA SPETTROMETRIA DI MASSA NELL'ANALISI DEGLI ALLERGENI "NASCOSTI" NEGLI ALIMENTI

***Gli allergeni alimentari "nascosti", dovuti a contaminazioni accidentali, rappresentano un problema di salute pubblica. L'articolo descrive come la spettrometria di massa possa contribuire ad affrontarlo grazie alla sua selettività e alla capacità di rilevare simultaneamente più allergeni, evidenziandone il ruolo complementare rispetto ai test immunoenzimatici usati nel controllo ufficiale.***

**N**egli ultimi anni il tema degli allergeni alimentari ha acquisito un'importanza crescente nell'opinione pubblica riconducibile alla forte risonanza mediatica di alcuni casi di cronaca con esiti fatali. Con il Regolamento (UE) n. 1169/2011 [1], l'Unione Europea ha individuato 14 allergeni che i produttori devono chiaramente indicare in etichetta quando utilizzati come ingredienti. L'elenco comprende: cereali contenenti glutine, crostacei, uova, pesce, arachidi, soia, latte, frutta a guscio (mandorle, noccioline, noci, anacardi, noci pecan, noci brasiliane, pistacchi, noci macadamia o del Queensland), sedano, senape, semi di sesamo, lupini, molluschi e solfiti. Ad eccezione dei solfiti, tutti gli allergeni in elenco sono molecole di natura proteica. Accanto a quelli intenzionalmente aggiunti (ingredienti), più subdola è la presenza involontaria di allergeni "nascosti", dovuta a fenomeni di cross-contaminazione accidentale lungo la filiera produttiva, presenza che può determinare gravi rischi per la popolazione allergica. Per mitigare tale rischio, vengono apposte le cosiddette *Precautionary Allergen Labelling* (PAL), con diciture del tipo "può contenere...". Tuttavia, l'uso esteso e non sempre giustificato delle PAL ha generato una progressiva "assuefazione" dei consumatori, che spesso tendono a ignorarle. Per superare questo approccio cautelativo indiscriminato, da tempo si auspica l'introduzione di limiti massimi per la cross-contaminazione, basati

sul concetto di *Reference Dose* che rappresenta una stima della quantità di allergene (in mg di proteine) in grado di provocare una reazione allergica oggettiva in una certa percentuale (tipicamente il 5%) degli individui allergici a quello specifico alimento [2]. In questo contesto, l'*Allergen Bureau*, autorevole organizzazione australiana a supporto dell'industria alimentare, ha definito su basi scientifiche le *Reference Doses* per numerosi allergeni, con l'obiettivo di promuovere un uso delle PAL fondato sull'analisi del rischio piuttosto che su un approccio puramente precauzionale (<https://vital.allergenbureau.net/>). 

I saggi immunoenzimatici ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), commercializzati fin dagli anni Novanta rappresentano tuttora la tecnica analitica maggiormente impiegata dai laboratori di controllo ufficiale come quelli degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. La loro grande diffusione è dovuta alla semplicità di esecuzione, alla rapidità di risposta e ai costi contenuti. Questi test sono prevalentemente utilizzati a scopo qualitativo (rilevato/non rilevato) e sul mercato sono disponibili kit sviluppati da diversi produttori per un'ampia gamma di allergeni (<https://doi.org/10.46756/sci.fsa.no660>). Tuttavia, negli alimenti sottoposti a trasformazioni tecnologiche (processi termici, meccanici o biochimici) le proteine allergeniche vanno incontro a fenomeni di denaturazione, frammenta- 

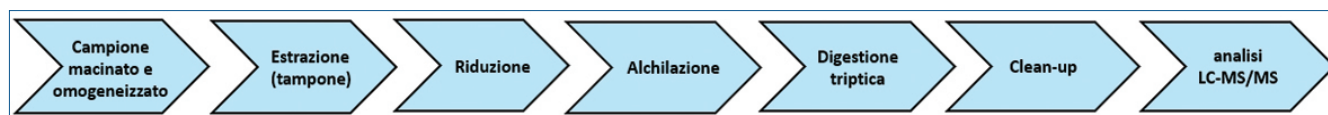


Fig. 1 - Tipico schema di preparazione del campione per l'analisi degli allergeni con l'approccio *bottom-up*. In alcuni metodi, lo step di clean-up è effettuato prima della digestione triptica

zione o modificazione chimica che ne alterano la struttura primaria, secondaria e terziaria. Tali modifiche possono compromettere il riconoscimento immunologico che si fonda sull'interazione tra epitopo e anticorpo. L'epitopo è quella porzione dell'antigene (proteina) in grado di legarsi allo specifico anticorpo utilizzato in un certo kit ELISA. La perdita dell'accessibilità all'epitopo target o la sua alterazione conformazionale può quindi determinare una ridotta reattività del sistema immunoenzimatico, con la possibilità di risultati falsi negativi. In misura più limitata, nell'ambito del controllo ufficiale vengono anche applicate tecniche biomolecolari basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR). Questi approcci consentono l'identificazione dell'allergene attraverso la rilevazione del DNA, senza una determinazione diretta delle proteine allergeniche. Di conseguenza, l'impiego della PCR dovrebbe essere confinato ad una valutazione preliminare [3].

A partire dall'inizio dello scorso decennio, vengono pubblicati i primi studi che si avvalgono della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) per la determinazione di allergeni in traccia negli alimenti, adottando il cosiddetto approccio *bottom-up*. Con questa strategia, viene misurata la proteina allergenica attraverso uno o più dei suoi peptidi marker generati mediante una digestione enzimatica [4]. L'analisi diretta delle proteine integre (approccio *top-down*) risulta, infatti, molto più complessa e con una sensibilità analitica non idonea alla valutazione delle cross-contaminazioni che richiede la possibilità di rilevare concentrazioni nell'ordine di poche parti per milione (mg di proteine allergeniche/kg). Prima dell'analisi strumentale, la preparazione del campione secondo l'approccio *bottom-up* prevede una sequenza articolata di fasi operative schematizzate in Fig. 1.

La digestione enzimatica delle proteine allergeniche è preceduta da una fase di riduzione, finalizzata alla rottura dei ponti disolfuro, seguita da

un'alchilazione che ne impedisce la riformazione. Questo trattamento consente di stabilizzare la struttura proteica e aumentare l'accessibilità ai siti di taglio dell'enzima, generalmente la tripsina, migliorando l'efficienza e la riproducibilità della digestione. Ai fini della rilevazione mediante spettrometria di massa, la selezione dei peptidi marker rappresenta una fase critica e richiede un approccio strutturato che integra valutazioni bioinformatiche, requisiti molecolari e verifiche sperimentali [4]. A partire dalle sequenze delle proteine allergeniche, viene effettuata una digestione triptica *in silico* per generare un insieme di peptidi candidati. Questi vengono quindi filtrati in base a criteri di proteotipicità (unicità rispetto ad altre specie e ingredienti), lunghezza appropriata, assenza di siti suscettibili a modificazioni chimiche e idoneità all'analisi LC-MS/MS in termini di ionizzazione e frammentazione. I peptidi selezionati sono successivamente validati sperimentalmente mediante l'analisi di estratti nella matrice reale, al fine di confermarne l'effettiva rilevabilità, la stabilità lungo il processo analitico e l'assenza di interferenze cromatografiche o isobariche. Le principali fasi dell'analisi bioinformatica sono schematizzate in Fig. 2. Per allergeni ampiamente studiati, quali latte e uova, la gamma dei peptidi marker è consolidata, semplificando la fase di selezione; tuttavia, tale processo non può essere completamente omesso, poiché la risposta strumentale dipende da molteplici fattori, tra cui la piattaforma analitica in uso e la matrice alimentare di interesse. L'approccio *bottom-up* consente di prescindere dalla struttura tridimensionale nativa della proteina, rendendo possibile la rilevazione dell'allergene anche in condizioni di marcata denaturazione o degradazione e superando così uno dei principali limiti dei metodi ELISA basati sul riconoscimento epitopico.

Nei metodi LC-MS/MS sviluppati per la determinazione di contaminanti (pesticidi, micotossine, farmaci veterinari etc.) in tracce negli alimenti l'elemento cardine della selettività analitica è rappre-

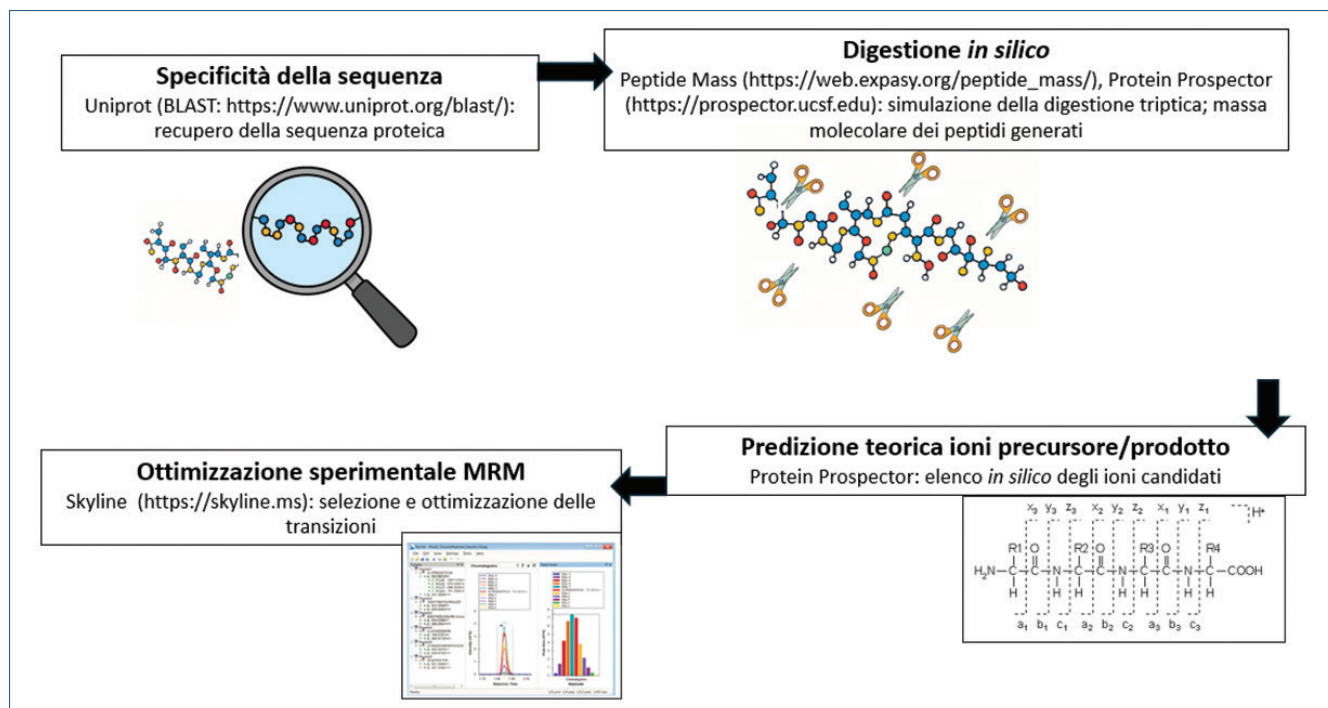


Fig. 2 - Software utilizzati nell'analisi bio-informatica per la scelta dei peptidi marker durante lo sviluppo di un metodo LC-MS/MS per allergeni

sentato da criteri di identificazione ampiamente condivisi a livello internazionale [5]. In particolare, nel caso dei rivelatori triplo quadrupolo, l'identificazione di un analita è considerata valida quando lo standard di riferimento e la molecola rilevata nel campione soddisfano 3 condizioni:

- almeno due transizioni diagnostiche in comune;
- stesso rapporto ionico tra le transizioni monitorate;
- stesso tempo di ritenzione cromatografico, ovvero entro una tolleranza compatibile con l'errore sperimentale.

Nel contesto dell'analisi degli allergeni, tali criteri di identificazione sono rafforzati dalla possibilità di monitorare simultaneamente per uno stesso allergene, più proteine caratteristiche e, per ciascuna di esse, più peptidi marker. Ad esempio, nel caso del latte, la selettività può essere incrementata sia monitorando simultaneamente peptidi marker di proteine differenti ( $\beta$ -lattoglobulina e  $\alpha$ -caseina), sia selezionando per ciascuna proteina più peptidi proteotipici, ciascuno verificato mediante i criteri di identificazione sopra riportati. Un altro vantaggio della tecnica LC-MS/MS è dato dalla possibilità di effettuare determinazioni multi-allergene, consentendo anche la quantificazione simultanea di

più allergeni in un'unica analisi. Tale caratteristica risulta particolarmente interessante nel controllo delle contaminazioni di produzioni complesse, tipiche dell'industria alimentare moderna. In letteratura sono riportate procedure in grado di determinare contemporaneamente fino a dieci allergeni in varie matrici alimentari, mentre con l'applicazione di tecniche ELISA sarebbe necessario l'impiego di un kit specifico per ciascuna proteina che si intende rilevare.

Ciò fin qui discusso riguarda gli aspetti analitici qualitativi; per quanto concerne, invece, la determinazione quantitativa, l'accuratezza dei metodi in LC-MS/MS rappresenta ad oggi un punto critico soprattutto per gli alimenti più complessi come i prodotti da forno, i dolci o i sughi pronti [6]. Va sottolineato che le prestazioni quantitative dei metodi per l'analisi degli allergeni assumerebbero un ruolo cruciale nel caso in cui il legislatore decidesse di fissare dei livelli massimi basati sulle *Reference Doses*. La difficoltà di un'analisi quantitativa risiede nel fatto che il misurando è la "massa totale di proteine allergeniche per massa di alimento", mentre l'entità effettivamente misurata è un peptide marker derivante dalla digestione enzimatica.

Sebbene proteina e peptidi siano in un rapporto molare 1:1, le fasi di preparazione del campione, in particolare la digestione triptica, possono avvenire con rese differenti nello standard e nel campione incognito, introducendo errori sistematici non controllabili. A questo si aggiunge l'impossibilità di applicare routinariamente una quantifica mediante diluizione isotopica, poiché la sintesi dello standard interno corrispondente al misurando, ovvero la proteina allergenica isotopicamente marcata, è molto impegnativa, tanto che in letteratura si trovano solo pochissimi esempi [6]. Nella maggior parte degli studi, quindi, vengono impiegati i peptidi marker marcati isotopicamente, che, pur essendo commercialmente disponibili, non sono in grado di compensare molti degli errori sistematici insiti nel procedimento analitico in quanto mimano in modo molto parziale il comportamento della proteina nativa. Alcuni ricercatori hanno esplorato l'impiego di standard interni marcati di tipo, per così dire "intermedio", quali i concatameri (QconCAT) e i peptidi marcati a catena lunga (*long-chain peptides*), concepiti per mimare la fase di digestione enzimatica [4]. Tuttavia, neanche queste molecole hanno dimostrato di poter migliorare significativamente l'accuratezza. In Fig. 3 sono schematizzati i tre tipi di standard interni qui discussi.

Anche per via di queste criticità, la disponibilità commerciale di materiali di riferimento in matrice (con valori di riferimento certificati o almeno "validati") è scarsa e, sebbene si organizzino annualmente numerosi circuiti interlaboratorio, questi sono orientati alla valutazione qualitativa delle prestazioni analitiche, risultando principalmente concepiti per i test ELISA. L'esame della letteratura mette in evidenza una notevole eterogeneità dei disegni sperimentali degli studi di validazione finalizzati alla stima delle prestazioni dei metodi. A ciò si affianca una varietà degli approcci alla taratura, che includono curve in matrice con l'aggiunta dei materiali di riferimento in differenti fasi della preparazione del campione, con o senza l'impiego di standard interni marcati, fino all'applicazione del metodo delle aggiunte standard [4, 6]. Non c'è neanche un consenso su quale sia il materiale di riferimento (standard) più adeguato: l'allergene o, piuttosto, i peptidi marker sintetici. Tutto ciò rende estremamente complesso il confronto tra le pre-

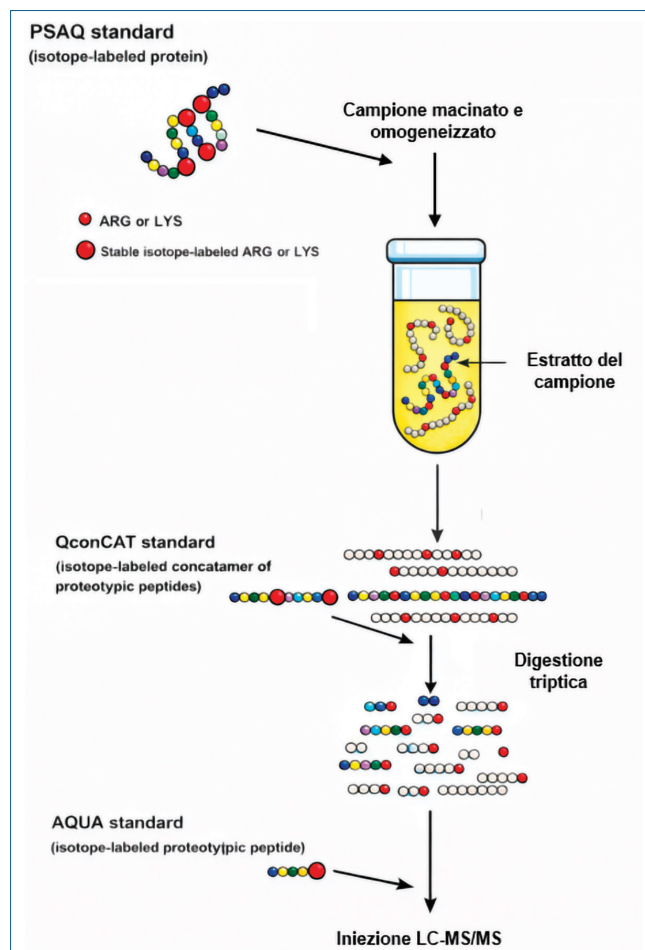


Fig. 3 - Struttura semplificata dei tre tipi di standard interni marcati discussi nel testo. PSAQ: Protein Standard Absolute Quantification; QconCAT: Quantitative ConCATemers; AQUA: Absolute QUantification. Modificata da [4] sotto i termini della licenza Creative Commons Attribution (CC BY)

stazioni delle procedure pubblicate. Nella quasi totale assenza di materiali di riferimento in matrice e di circuiti interlaboratorio, non è possibile effettuare un controllo di qualità esterno che permetterebbe di valutare l'esattezza dei metodi. La situazione potrebbe migliorare con l'emanazione di linee guida internazionalmente riconosciute, analogamente a quanto avvenuto, ad esempio, nel settore dell'analisi delle proteine in ambito clinico [7]. In questo modo si armonizzerebbero gli studi di validazione favorendo quantomeno la comparabilità dei metodi sviluppati dai diversi laboratori, pur nella consapevolezza che, per quanto detto, le prestazioni analitiche non possano eguagliare quelle tipiche delle procedure quantitative sviluppate per le "piccole molecole".



In conclusione, i saggi immunoenzimatici (ELISA) sono uno strumento insostituibile nel controllo ufficiale degli allergeni alimentari, consentendo l'analisi di un elevato numero di campioni in tempi rapidi. In questo contesto, anche per i suoi costi, la spettrometria di massa si configura come tecnica complementare, fondata sul riconoscimento molecolare dei peptidi e pertanto intrinsecamente più selettiva, in grado di fornire una conferma definitiva nei casi di campioni risultati positivi ai test immunoenzimatici o biomolecolari. Ulteriori progressi possono essere compiuti per migliorare l'accuratezza della determinazione quantitativa e ampliare la gamma degli allergeni analizzabili mediante metodi LC-MS/MS.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] Regolamento (UE) n. 1169/2011, *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, 2011, L 304, 18.
- [2] T. Holzhauser, P. Johnson *et al.*, *Food and Chemistry Toxicology*, 2020, **145**, 111709.
- [3] G. O'Connor, F. Ulberth, European Commission - JRC Technical Reports, 2017, JRC108259.
- [4] M. Planque, T. Arnould *et al.*, *Food Allergen Analysis: Detection, Quantification and*
- Validation by Mass Spectrometry*, IntechOpen, 2017, DOI: **10.5772/intechopen.69361**
- [5] H. Cantwell (Ed.) Eurachem Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, H. Cantwell (Ed.) Eurachem Guide 3<sup>rd</sup> Ed., Eurachem, 2025.
- [6] L. Murru, D. Giusepponi *et al.*, *Microchemical Journal*, 2026, 220, 116574.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Quantitative Measurement of Proteins and Peptides by Mass Spectrometry, CLSI document C64, 2019.

#### Mass-Spectrometry for the Analysis of "Hidden" Food Allergens

"Hidden" food allergens resulting from accidental cross-contamination pose a major public health challenge. This article illustrates how mass spectrometry can address this issue through its high selectivity and ability to detect multiple allergens simultaneously, highlighting its complementary role to immunoenzymatic tests used in official control.



Organo Ufficiale della Società Chimica Italiana

Da più di cento anni  
la rivista per chi si occupa  
di **Chimica in Italia**

Scarica la app gratuita per leggere  
La Chimica e l'Industria  
sui tuoi dispositivi elettronici

