



**PROGETTO: "LA SENAPE COME ALLERGENE ALIMENTARE: OTTIMIZZAZIONE DI UN PROTOCOLLO CONDIVISO PER LA VERIFICA DI TEST ANALITICI PER LA RILEVAZIONE NEI PRODOTTI CEREALICOLI"**

**RELAZIONE FINALE**

**INDICE**

Premessa ..... 2

Capitolo 1. Censimento dei test disponibili in commercio e analisi dei report di validazione forniti ..... 2

Capitolo 2. Scelta e reperimento dei kit ..... 3

Capitolo 3. Reperimento delle farine blank ..... 4

Capitolo 4. Esiti analitici ottenuti per le farine blank ..... 5

Capitolo 5. Spiking materials ..... 6

Capitolo 6. Prove preliminari *Sinapis arvensis* ..... 7

Capitolo 7. Spiked samples ..... 7

Capitolo 8. Risultati spiked samples in PCR ..... 8

Capitolo 9. Risultati spiked samples in ELISA ..... 33

Capitolo 10. Discussione e valutazione dei risultati ..... 44

Premessa

La problematica della contaminazione da semi di senape nel grano italiano rappresenta un problema sanitario e commerciale di interesse nazionale.

Considerando che ad oggi non risultano disponibili metodi di riferimento ufficiali per la rilevazione negli alimenti di sostanze e prodotti che provocano allergie o intolleranze, e che i laboratori del controllo ufficiale adottano metodi basati principalmente su tecniche immunoenzimatiche (ELISA) e molecolari (PCR), il Centro di Referenza Nazionale per la rilevazione negli alimenti di sostanze e prodotti che provocano allergie o intolleranze (CReNaRiA) dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle D’Aosta e il Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica dell’Istituto Superiore di Sanità si sono resi disponibili a predisporre un idoneo protocollo metodologico atto alla valutazione sperimentale dei KIT analitici attualmente proposti allo scopo.

La presente relazione descrive le fasi progettuali svolte e i risultati ottenuti dal gruppo di lavoro CReNaRiA – ISS descritto nella Tabella 1.

Tabella 1. Gruppo di lavoro dedicato al progetto.

ENTE	NOMINATIVO	RUOLO
CReNaRiA	Lucia Decastelli	Responsabile CReNaRiA fino al 31/03/2024
	Daniela Manila Bianchi	Responsabile CReNaRiA dal 01/04/2024
	Clara Tramuta	Biotecnologo
	Sara Morello	Chimico
	Samantha Lupi	Chimico
	Irene Floris	Biotecnologo
ISS	Paolo Stacchini	Responsabile UO Sicurezza Chimica negli Alimenti Dip. SANV
	Augusto Pastorelli	Responsabile Settore Analitico Allergeni
	Concetta Boniglia	Biologo
	Marzia De Giacomo	Chimico

Capitolo 1. Censimento dei test disponibili in commercio e analisi dei report di validazione forniti

Nella prima fase del progetto si è proceduto con un censimento dei test esistenti in commercio per la rilevazione di senape in alimenti applicabili su campioni di prodotti cerealicoli. Questa attività è stata svolta attraverso:

- valutazione della letteratura scientifica internazionale;
- inviti diretti alle principali ditte produttrici e rivenditrici di test per la rilevazione di allergeni alimentari;
- pubblicazione di un avviso sulla Gazzetta Europea, circa la disponibilità e le caratteristiche tecniche di test immunoenzimatici e di biologia molecolare per la rilevazione di senape in prodotto cerealicoli.

Le aziende produttrici sono state invitate a produrre i dati di validazione interna effettuata durante le fasi di ottimizzazione del metodo ed eventuali documenti di parte terza attestanti certificazioni o validazioni indipendenti.

La documentazione fornita dalle aziende è stata esaminata con particolare riferimento, laddove disponibile, a:

- Informazioni su composizione reagenti e standard forniti;
- Espressione unità di misura;
- Campo di applicazione;
- Limit of detection (LOD);
- Limit of quantification (LOQ);
- Recupero;
- Precisione;
- Cross-reattività dichiarate;
- Certificazioni di enti terzi.

In base alla documentazione fornita dalle aziende, è stata costruita una griglia per il confronto dei dossier di validazione che è allegata alla presente relazione (Allegato 1). Essa riporta la tipologia di approccio del test esaminato (ELISA, Real-Time PCR, End-point PCR), nonché un riepilogo delle caratteristiche tecniche dei metodi e delle performance teoriche dichiarate dal produttore.

Capitolo 2. Scelta e reperimento dei kit

Su un totale di 16 aziende produttrici di test analitici per la rilevazione di senape in alimenti (n = 10 KIT ELISA; n = 6 KIT PCR) sono pervenuti 13 dossier di validazione interni, che sono stati sottoposti a valutazione dai componenti del gruppo di lavoro per le attività di laboratorio.

In particolare, sono stati esaminati:

- 8 test con approccio immunoenzimatico: ELISA-based (Tabella 2)
- 5 test con approccio molecolare: PCR-based (Tabella 3) di cui:
  - o 4 Real-Time PCR
  - o 1 End-point PCR

Tabella 2. Riepilogo kit per test ELISA.

KIT
R-Biopharm, RIDASCREEN® FAST Senf/Mustard n. R6152
Eurolab Safefood Hygiene, AlerTox ELISA Mustard
Eurofins Tecna, SENSISpec ELISA Mustard
Arigo Bio (DBA Italia), Mustard ELISA Kit
KAIROSafe (Bio-Check), Mustard (Senape) Check ELISA Kit
Neogen, VERATOX FOR MUSTARD ALLERGEN
Romer Labs, AGRAQUANT ALLERGEN – MUSTARD
Romer Labs, AGRAQUANT ALLERGEN – MUSTARD – PLUS

Tabella 3. Riepilogo kit per PCR.

KIT
Generon, SPECIALfinder MC Mustard Kit
R-Biopharm SureFood® ALLERGEN Mustard
4LAB, MustardKit Real Time PCR
Bioside, qualyfast® Mustard
FEM2-Ambiente

Per gli approcci biomolecolari PCR-based R-Biopharm e Generon sono stati utilizzati i metodi di estrazione del DNA forniti dalle ditte, come indicato in Tabella 4. Le analisi con i metodi End-Point PCR FEM2 e con i metodi Real-Time PCR Bioside e 4LAB, invece, sono state condotte con DNA estratto secondo la ISO 21571:2013: Foodstuffs –Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction e con il kit Aurogene, Gene Matrix Food extra DNA.

Tabella 4. Metodi di estrazione e di amplificazione utilizzati nello studio.

Estrazione DNA	Amplificazione
ISO 21571:2013; Aurogene, GeneMATRIX FOOD-EXTRA DNA	Metodo End Point PCR FEM2 Srl (Merk illustra™ PuReTaq RTG PCR)
	Bioside, qalyfast® Mustard
	4LAB, MustardKit Real-Time PCR
R-Biopharm, SureFood® PREP Advanced	R-Biopharm SureFood® ALLERGEN Mustard
Generon, ION Force DNA Extractor FAST	Generon, SPECIALfinder MC Mustard Kit

Capitolo 3. Reperimento delle farine blank

Il reperimento di campioni di farina senape-free è la condizione indispensabile per le attività di verifica delle performance dei test inclusi nel progetto. Per questo motivo i partner del progetto sono stati invitati a fornire campioni di farine blank (grano tenero, grano duro, integrale, raffinata) da utilizzate al fine di valutare le performance dei test analitici. L’IZSPLV ha provveduto a reperire, da aziende esterne e punti vendita della DGO, campioni di farine da impiegare come blank material (Tabella 5).

Tabella 5. Riepilogo delle matrici reperite da ciascun fornitore.

ID campione	Tipo campione	Fornitore
1	Farina di grano tenero	Esterno 1
2	Granaglie (grano tenero)	
3	Granaglie (grano tenero) integrale	
4	Granaglie (grano tenero) integrale	
5	Granaglie (grano tenero) integrale	
6	Granaglie (grano tenero) integrale	
7	Granaglie (grano tenero) integrale	
8	Granaglie (grano tenero) integrale	
9	Farina integrale di grano tenero	Esterno 2
10	Farina di grano tenero	
11	Farina integrale di grano duro	
12	Farina di grano duro	Partner 1
13	Farina di grano tenero	
14	Farina di grano duro	Commercio
15	Semola di grano duro integrale	
16	Semola di grano duro integrale	
17	Semola di grano duro	
18	Semola di grano duro	
19	Semola di grano duro	
20	Semola di grano duro	
21	Semola di grano duro	

Capitolo 4. Esiti analitici ottenuti per le farine blank

Sono di seguito riportati (Tabella 6) gli esiti analitici ottenuti per la determinazione della presenza di senape in matrici presunte senape free reperite durante la prima parte del progetto.

Tabella 6. Riepilogo risultati farine blank con metodi PCR ed ELISA

ID CAMP.	PCR						ELISA			
	KIT A (Estraz.Kit A +PCR kit A)	KIT B (Estraz. Kit B +PCR kit B)	KIT C (Estraz. Kit A +PCR kit C)	KIT D (Estraz. Kit A +PCR kit D)	KIT E (Estraz. Kit B +PCR kit C)	KIT F (Estraz.kit B +PCR kit D)	KIT G	KIT H	KIT I	KIT L
1	positivo	positivo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	n.e.	n.e.	n.e.
2	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo
3	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
4	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
5	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
6	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
7	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
8	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
9	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
10	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
11	negativo	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo
12	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo	negativo	n.e.	n.e.	n.e.
13	positivo	positivo	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	positivo	positivo	positivo	positivo
14	positivo	positivo	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	positivo	positivo	positivo	positivo

n.e.: Prove non eseguite

Nella seconda parte del progetto, sono stati reperiti ulteriori campioni di semola di grano duro integrale e non integrale: sono di seguito riportati gli esiti analitici ottenuti mediante l’impiego del KIT real time B per la determinazione della presenza di senape (Tabella 7).

Tabella 7. Esiti Realtime PCR su campioni di semola di grano duro

ID campione	Categoria	Real time PCR (Ct)
		POS se Ct<35 cicli LOD 0.5 ppm
15	Semola di grano duro integrale	33.71
16	Semola di grano duro integrale	32.03
17	Semola di grano duro	32.11
18	Semola di grano duro	33.71
19	Semola di grano duro	31.97
20	Semola di grano duro	31.29
21	Semola di grano duro	33.16

Ct maggiori sono stati ottenuti per i campioni 15 (grano duro integrale) e 18 (grano duro). Pertanto, sulla base dei risultati ottenuti e alla difficoltà di reperimento dei campioni senape-free, sono state acquistate aliquote (circa 7 kg) rispettivamente delle due tipologie di campioni di semola al fine di effettuare le successive prove di spike con i target e gli untarget.

Capitolo 5. Spiking materials

Per la fortificazione dei campioni sono stati utilizzati materiali provenienti da diversi fornitori. Le prime prove preliminari sono state condotte con un materiale commerciale (*Brassica napus*). Successivamente il CREA (DC Consiglio per la ricerca in agricoltura e l’analisi dell’economia agraria, Centro di ricerca Difesa e Certificazione Sede di Tavazzano) ha reso disponibili gli spiking materials (Tabella 8), in purezza sotto forma di semi e macinati a granulometria certificata nei propri laboratori. I semi forniti appartengono alle seguenti specie:

Tabella 8. Descrizione degli spiking materials.

Famiglia	Genere	Specie (nome scientifico)	Specie (nome comune)
<i>Brassicaceae</i> target	<i>Sinapis</i>	<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca
		<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera
		<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna
		<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica
<i>Brassicaceae</i> interferenti	<i>Brassica</i>	<i>Brassica napus</i>	Colza
		<i>Brassica rapa</i>	Rapa
		<i>Brassica oleracea</i>	Cavolfiore
		<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d’Abissinia
	<i>Raphanus</i>	<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello

Le farine sono state utilizzate nella fase successiva per l’allestimento dei campioni contaminati.

Capitolo 6. Prove preliminari *Sinapis arvensis*

Inizialmente è stata reperita un'aliquota di *Sinapis arvensis* di provenienza non certificata su cui sono state effettuate prove preliminari in acqua ultra-pura mediante l'impiego dei KIT A e B. Nello specifico il DNA è stato estratto, successivamente diluito in acqua ultra-pura mediante diluizioni seriali fino ad una concentrazione finale di 10 ppm, prevista per i target, e amplificato. Come si evince dalla Tabella 9, entrambi i KIT hanno evidenziato la presenza di *Sinapis arvensis*, con valori di Ct compresi tra 24.15-24.51 per il KIT A e 23.41-24.25 per il KIT B.

Tabella 9. Risultati preliminari campioni di *Sinapis arvensis* non certificata 10 ppm

Specie target	Nome comune	KIT A	KIT B
		POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	24.51	23.62
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	24.15	23.41
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	24.18	24.25

Successivamente un'aliquota di *Sinapis arvensis* di provenienza certificata è stata utilizzata per la preparazione dei campioni di grano tenero integrale fortificata a 10 ppm al fine di valutare le performance dei metodi in PCR (capitoli 7 e 8).

Capitolo 7. Spiked samples

Campioni di i) granaglie di grano tenero integrale (ID 7), ii) semola di grano duro integrale (ID 15) e iii) semola di grano duro (ID 18) senape-free, selezionati in base ai risultati ottenuti nella fase precedente, sono stati macinati a granulometria certificata (0.75mm) ed omogenizzati per poi essere utilizzati per la preparazione degli spiked samples. La procedura di preparazione degli spike prevede una macinazione ripetuta (x2) con il mulino ZM200 e con setaccio certificato a 0,75mm del mix ottenuto ad una concentrazione di 1000 o 2000 ppm, a seconda della concentrazione finale che si vuole ottenere. Segue una miscelazione del campione per 3h e successiva diluizione con farina bianca per ottenere un prodotto a concentrazione 10 ppm per le farine target e 500 ppm per le farine untarget. La macinazione si ripete per 2 volte ancora prima di effettuare le prove di omogeneità.

Per le prove di omogeneità, le farine target (10 ppm) sono state suddivise in 7 sotto campioni e, per ciascun sotto campione, è stata eseguita un'estrazione in doppio di DNA; la quantificazione è stata eseguita con tecnica PCR utilizzando il kit commerciale B. In particolare, aliquote dei campioni sono state contaminate alle seguenti concentrazioni finali con semi target o untarget:

- *Sinapis alba* 10 ppm (target)
- *Sinapis nigra* 10 ppm (target)
- *Sinapis juncea* 10 ppm (target)
- *Sinapis arvensis* 10 ppm (target)
- *Brassica napus* 500 ppm (untarget)
- *Brassica oleracea* 500 ppm (untarget)
- *Brassica rapa* 500 ppm (untarget)
- *Brassica carinata* 500 ppm (untarget)

- *Raphanus sativus* 500 ppm (untarget)
- Confermata l’omogeneità, su ciascun campione è stata effettuata l’estrazione del DNA in triplicato e l’amplificazione mediante l’impiego dei seguenti kit PCR:
- kit A: Estraz. DNA kit A e PCR kit A
  - kit B: Estraz. DNA kit B e PCR kit B
  - kit C: Estraz. DNA ISO 21571:2013 e PCR kit C
  - kit D: Estraz. DNA ISO 21571:2013 e PCR kit D
  - kit E: Estraz. DNA ISO 21571:2013 e PCR kit E

Capitolo 8. Risultati spiked samples in PCR

8.1 Risultati real-time PCR farina di grano tenero integrale

I risultati degli spiked samples testati in PCR con i kit A, kit B, kit C e kit D sono riportati rispettivamente in Tabella10, Tabella 11, Tabella 12 e Tabella 13.

Tabella 10. Risultati real-time PCR kit A farina di grano tenero integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit A POS se Ct<35 cicli LOD 0.5 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	24.07
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	25.48
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	23.81
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	23.84
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	24.46
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	24.36
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	21.12
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	21.49
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	21.37
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	22.94
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	23.35
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	23.05
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	31.34
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	34.23
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	33.5
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	31.89
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	22.91
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	28.17
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	23.65



<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	15.45
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	15.27
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	15.31
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	33.16
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	26.98
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	29.04

Tabella 11. Risultati real-time PCR kit B farina di grano tenero integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit B POS se Ct<35 cicli LOD 0.4 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	21.45
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	20.39
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	20.42
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	28.03
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	29.09
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	28.23
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	29.29
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	30.48
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	29.4
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	28.24
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	28.59
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	28.38
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	30.33
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	34.51
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	34.98
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	31.32
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	30.21
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	33.01
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	22.02
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	21.13
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	20.89
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo

<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo
------------------------------------	-----------	----------

Tabella 12. Risultati real-time PCR kit C farina di grano tenero integrale fortificata con i target a 10, 100, 500, 1000 ppm e con gli untarget a 500 ppm

		10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
Specie	Nome comune	kit C POS se Ct<40 cicli LOD 0.5 ppm			
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	negativo	29	27.48	25.76
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	negativo	n.e.	n.e.	n.e.
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	negativo	n.e.	n.e.	n.e.
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	non valido	33.38	28.46	29
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo	n.e.	n.e.	n.e.
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo	n.e.	n.e.	n.e.
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo	negativo	27.91	26.75
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	non valido	n.e.	n.e.	n.e.
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	non valido	n.e.	n.e.	n.e.
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo	34.2	32.45	31.09
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo	n.e.	n.e.	n.e.
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo	n.e.	n.e.	n.e.
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	n.e.	n.e.	negativo	n.e.
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	n.e.	n.e.	non valido	n.e.
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	n.e.	n.e.	negativo	n.e.
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	n.e.	n.e.	non valido	n.e.
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	n.e.	n.e.	non valido	n.e.
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	n.e.	n.e.	non valido	n.e.
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	n.e.	n.e.	negativo	n.e.
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	n.e.	n.e.	non valido	n.e.
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	n.e.	n.e.	negativo	n.e.
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	n.e.	n.e.	non valido	n.e.
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	n.e.	n.e.	25.94	n.e.
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	n.e.	n.e.	24.81	n.e.
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	n.e.	n.e.	non valido	n.e.
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	n.e.	n.e.	non valido	n.e.
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	n.e.	n.e.	non valido	n.e.

n.e.: Prove non eseguite  
non valido: controllo interno di amplificazione negativo

Tabella 13. Risultati real-time PCR kit D farina di grano tenero integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit D POS se Ct<35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	26.41
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	26.61
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	25.68
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	30.7
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	31.01
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	31
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	31.01
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	31.7
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo

I risultati ottenuti per i campioni spiked con i target *Sinapis alba* 10 ppm, *Sinapis nigra* 10 ppm e *Sinapis juncea* 10 ppm e *Sinapis arvensis* 10 ppm sono riportati in Tabella 14, Tabella 15, Tabella 16 e Tabella 17.

Tabella 14. Risultati campioni spiked con *Sinapis alba* 10 ppm

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct<35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	24.07	21.45	negativo	26.41
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	25.48	20.39	negativo	26.61
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	23.81	20.42	negativo	25.68

Tabella 15. Risultati campioni spiked con *Sinapis nigra* 10 ppm

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct<35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	23.84	28.03	non valido	negativo
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	24.46	29.09	negativo	negativo
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	24.36	28.23	negativo	negativo

Tabella 16. Risultati campioni spiked con *Sinapis juncea* 10 ppm.

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct<35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	21.12	29.29	negativo	negativo
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	21.49	30.48	non valido	negativo
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	21.37	29.4	non valido	negativo

Tabella 17. Risultati campioni spiked con *Sinapis arvensis* certificata 10 ppm

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct<35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm

<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	22.94	28.24	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	23.35	28.59	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	23.05	28.38	negativo	negativo

I risultati ottenuti per i campioni spiked con gli untarget *Brassica napus* 500 ppm, *Brassica oleracea* 500 ppm, *Brassica rapa* 500 ppm, *Brassica carinata* 500 ppm e *Raphanus sativus* 500 ppm sono riportati in Tabella 18, Tabella 19, Tabella 20, Tabella 21 e Tabella 22.

Tabella 18. Risultati campioni spiked con *Brassica napus* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Brassica napus</i>	Colza	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	31.34	30.33	negativo	negativo
<i>Brassica napus</i>	Colza	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	34.23	34.51	non valido	negativo
<i>Brassica napus</i>	Colza	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	33.5	34.98	negativo	negativo

Tabella 19. Risultati campioni spiked con *Brassica oleracea* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	negativo	negativo	non valido	negativo
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	31,89	negativo	non valido	negativo
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	negativo	negativo	non valido	negativo

Tabella 20. Risultati campioni spiked con *Brassica rapa* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm

<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	22.91	31.32	negativo	30.7
<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	28.17	30.21	non valido	negativo
<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	23.65	33.01	negativo	negativo

Tabella 21. Risultati campioni spiked con *Brassica carinata* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d'Abissinia	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	15.45	22.02	non valido	31.01
<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d'Abissinia	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	15.27	21.13	25.94	31
<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d'Abissinia	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	15.31	20.89	24.81	negativo

Tabella 22. Risultati campioni spiked con *Raphanus sativus* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	33.16	negativo	non valido	31.01
<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	26.98	negativo	non valido	31.7
<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	29.4	negativo	non valido	negativo

Un discorso a parte va fatto per il kit E (metodo PCR end point, visualizzazione su gel). Il Kit prevede l'utilizzo di tre coppie di primers per amplificare e discriminare le specie di senape (*S. nigra*, *S. juncea* e *S. alba*) da colza ed altre *Brassicaceae*. Tutte le *Brassicaceae* sono state correttamente amplificate utilizzando la prima coppia di primers (270 bp LOD 2 ppm) (Tabella 23, Figura 1 e Figura 2).

Tabella 23. Risultati campioni spiked amplificati con il kit E

Specie	Nome comune	I coppia primers: BraF/BraR 270bp	II coppia di primers: BnjF/BnjR 300bp	III coppia di primers: SalF/SalR 250bp
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	positivo	negativo	positivo
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	positivo	negativo	positivo
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	positivo	negativo	positivo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	positivo	positivo	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	positivo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo

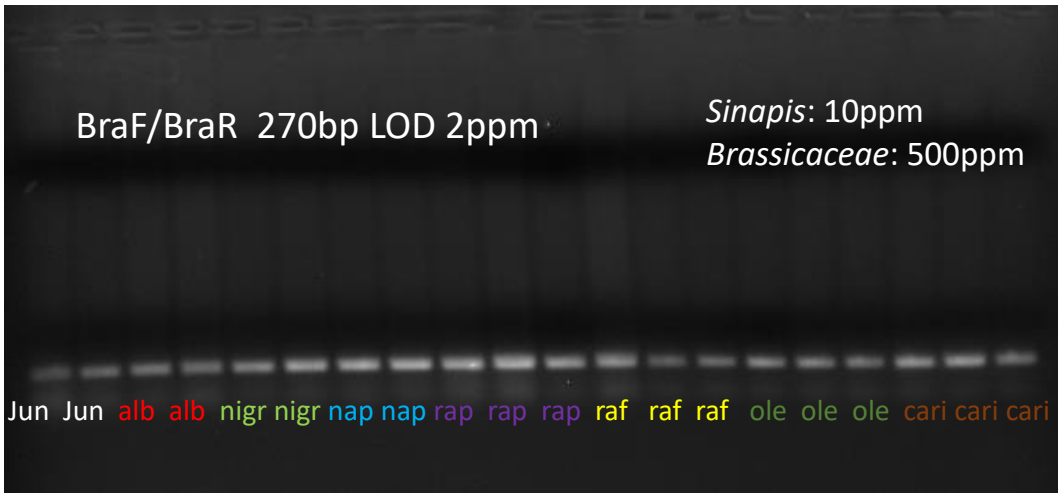


Figura 1. Risultati campioni spiked amplificati con il kit E, mediante la II coppia di primer

La II coppia di primers ha correttamente amplificato *S. nigra* e *S. juncea* (300bp, LOD 20ppm). Chiaramente il segnale è un po' debole visto il valore del LOD del metodo e le concentrazioni di *S. nigra* e *S. juncea* a 10ppm.

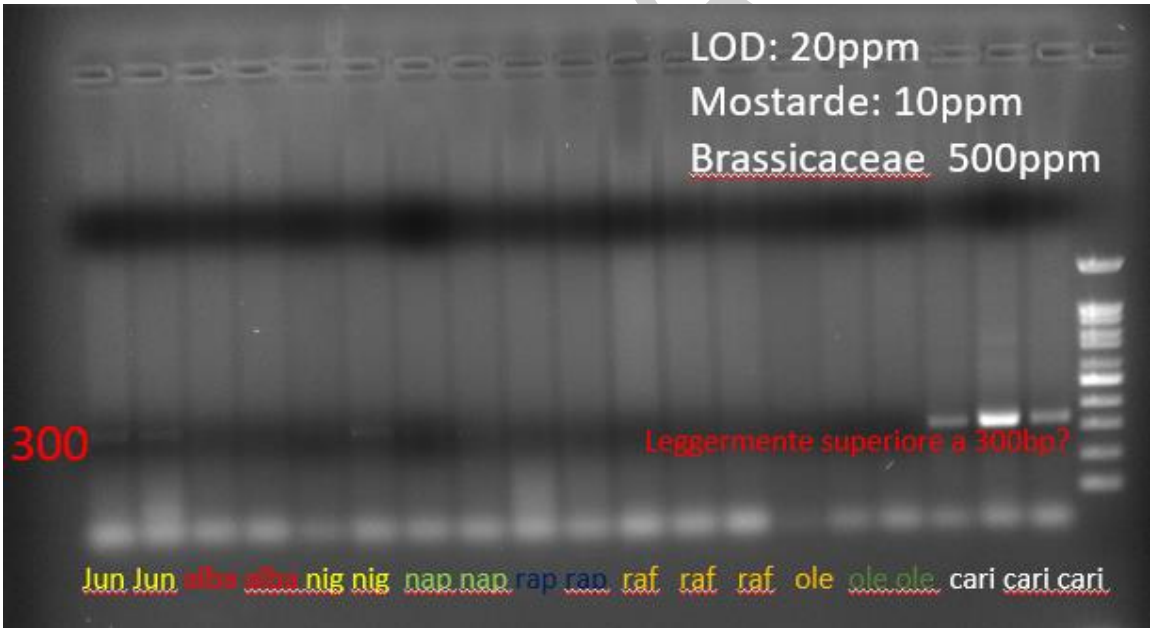


Figura 2. Risultati campioni spiked amplificati con il kit E, mediante la III coppia di primer

La III coppia di primers ha correttamente amplificato la sola *S. alba* (250 bp LOD 10ppm).



8.2 Risultati real-time PCR semola di grano duro integrale

I risultati degli spiked samples testati in PCR con i kit A, kit B, kit C e kit D sono riportati rispettivamente in Tabella 24, Figura 3, Tabella 25, Tabella 26, Figura 4 e Tabella 27.

Tabella 24. Risultati real-time PCR kit A semola di grano duro integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit A POS se Ct<35 cicli LOD 0.5 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	26.26
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	26.34
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	25.88
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	25.63
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	25.58
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	25.56
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	26.01
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	25.76
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	26.13
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	25.7
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	26.02
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	25.85
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	29.44
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	28.83
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	28.36
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	28.66
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	29.17
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	29.12
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	29.72
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	29.68
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	29.28
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	19.5
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	19.61
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	19.37
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	31.81
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	34.21
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	31.77

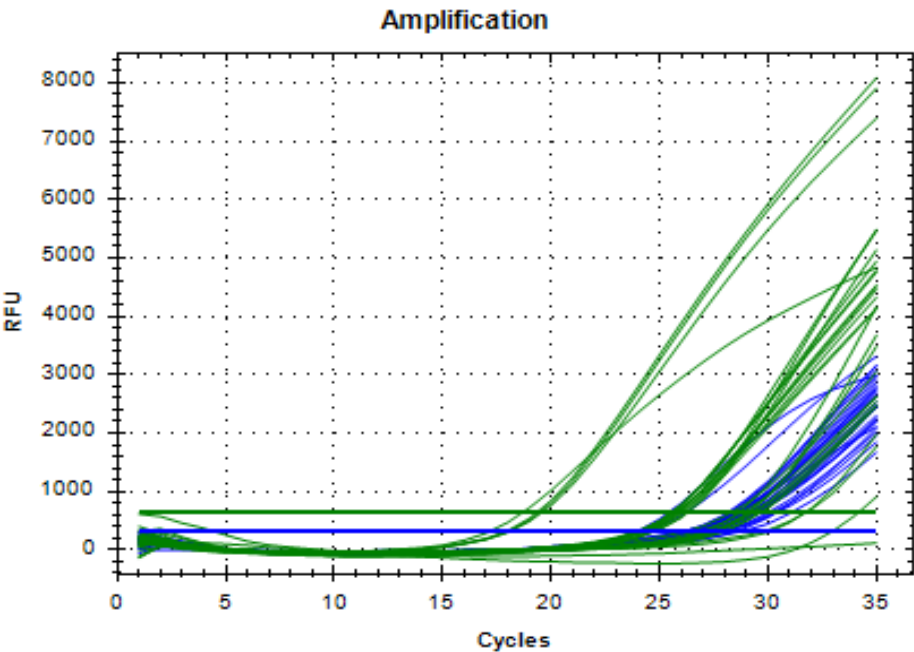


Figura 3. Risultati real-time PCR kit A semola di grano duro integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Tabella 25. Risultati real-time PCR kit B semola di grano duro integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit B POS se Ct<35 cicli LOD 0.4 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	28.75
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	29.01
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	29.04
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	34.39
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	34.73
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	34.97
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	33.64
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo

<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	33.25
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	33.34
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	33.75
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	33.1
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	32.84
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	34.54

Tabella 26. Risultati real-time PCR kit C semola di grano duro integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit C POS se Ct<40 cicli LOD 0.5 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	negativo
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	negativo
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo

<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	30.21
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	30.81
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	30.29
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	non valido
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	non valido

non valido: controllo interno di amplificazione negativo

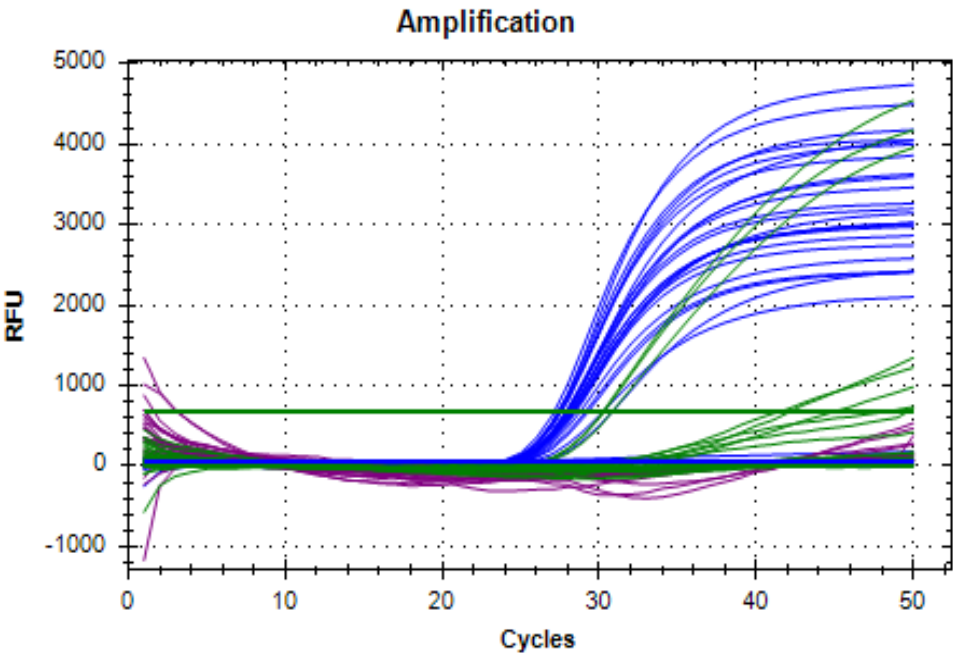


Figura 4. Risultati real-time PCR kit C semola di grano duro integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Tabella 27. Risultati real-time PCR kit D semola di grano duro integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit D POS se Ct<35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	29.46
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	28.79
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	28.24
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	34.14
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	34.01

<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	32.82
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	33.05
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	33.01
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	32.03
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	31.56
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	31.91
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	33.61
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	33.81
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	34.09
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	34.32
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	34.05
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	34.19

I risultati ottenuti per i campioni spiked con i target *Sinapis alba* 10 ppm, *Sinapis nigra* 10 ppm e *Sinapis juncea* 10 ppm e *Sinapis arvensis* 10 ppm sono riportati in Tabella 28, Tabella 29, Tabella 30 e Tabella 31.

Tabella 28. Risultati campioni spiked con *Sinapis alba* 10 ppm

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	26.26	28.75	negativo	29.46
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	26.34	29.01	negativo	28.79
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	25.88	29.04	negativo	28.24

Tabella 29. Risultati campioni spiked con *Sinapis nigra* 10 ppm

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli	POS se Ct <35 cicli	POS se Ct <40 cicli	POS se Ct < 35 cicli

			LOD 0.5 ppm	LOD 0.4 ppm	LOD 0.5 ppm	LOD 5 ppm
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	25.63	34.39	negativo	negativo
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	25.58	34.73	negativo	negativo
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	25.56	negativo	negativo	negativo

Tabella 30. Risultati campioni spiked con *Sinapis juncea* 10 ppm.

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	26.01	negativo	negativo	34.14
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	25.76	34.97	negativo	negativo
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	26.13	negativo	negativo	34.01

Tabella 31. Risultati campioni spiked con *Sinapis arvensis* certificata 10 ppm

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	25.7	negativo	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	26.02	negativo	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	25.85	33.64	negativo	negativo

I risultati ottenuti per i campioni spiked con gli untarget *Brassica napus* 500 ppm, *Brassica oleracea* 500 ppm, *Brassica rapa* 500 ppm, *Brassica carinata* 500 ppm e *Raphanus sativus* 500 ppm sono riportati in Tabella 32, Tabella 33, Tabella 34, Tabella 35 e Tabella 36.

Tabella 32. Risultati campioni spiked con *Brassica napus* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5	POS se Ct < 35 cicli LOD 5

			ppm	ppm	ppm	ppm
<i>Brassica napus</i>	Colza	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	29.44	negativo	negativo	32.82
<i>Brassica napus</i>	Colza	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	28.83	negativo	negativo	33.05
<i>Brassica napus</i>	Colza	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	28.36	negativo	negativo	33.01

Tabella 33. Risultati campioni spiked con *Brassica oleracea* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	28.66	negativo	negativo	32.03
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	29.17	negativo	negativo	31.56
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	29.12	negativo	negativo	31.91

Tabella 34. Risultati campioni spiked con *Brassica rapa* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	29.72	33.25	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	29.68	33.34	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	29.28	33.75	negativo	negativo

Tabella 35. Risultati campioni spiked con *Brassica carinata* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d'Abissinia	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	19.5	negativo	30.21	33.61

<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d'Abissinia	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	19.61	33.1	30.81	33.81
<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d'Abissinia	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	19.37	32.84	30.29	34.09

Tabella 36. Risultati campioni spiked con *Raphanus sativus* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	31.81	non valido	non valido	34.32
<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	34.21	negativo	non valido	34.05
<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	31.77	34.54	non valido	34.19

I risultati dei campioni spiked con i target (10ppm) e con gli untarget (500ppm), ottenuti mediante end-point PCR con il kit E, sono riportati nella tabella 37.

Tabella 37. Risultati end-point PCR kit E semola di grano duro integrale fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	I coppia primers: BraF/BraR 270bp	II coppia di primers: BnjF/BnjR 300bp	III coppia di primers: SalF/SalR 250bp
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	positivo	negativo	positivo
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	positivo	negativo	positivo
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	positivo	negativo	positivo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	positivo	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	positivo	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	positivo	negativo	negativo



<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	positivo	positivo	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	positivo	positivo	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	positivo	positivo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo

8.3 Risultati real-time PCR semola di grano duro

I risultati degli spiked samples testati in PCR con i kit A, kit B, kit C e kit D sono riportati rispettivamente in Tabella 38, Tabella 39, Figura 5, Tabella 40 e Tabella 41, Figura 6.

Tabella 38. Risultati real-time PCR kit A semola di grano duro fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit A POS se Ct<35 cicli LOD 0.5 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	24.68
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	24.71
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	23.85
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	23.01
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	23.16
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	23.05
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	22.78
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	22.55
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	22.68
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	22.36
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	30.45
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	22.81
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	32.97

<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	33.22
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	33.04
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	32.65
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	32.57
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	33.07
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	30.89
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	30.78
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	30.86
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	17.46
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	16.96
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	17.17
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	32.75
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	32.53
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	32.78

Tabella 39. Risultati real-time PCR kit B semola di grano duro fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit B POS se Ct<35 cicli LOD 0.4 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	28.42
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	28.66
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	28.94
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	33.16
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo

<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	27.62
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	29.32
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	27.68
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo

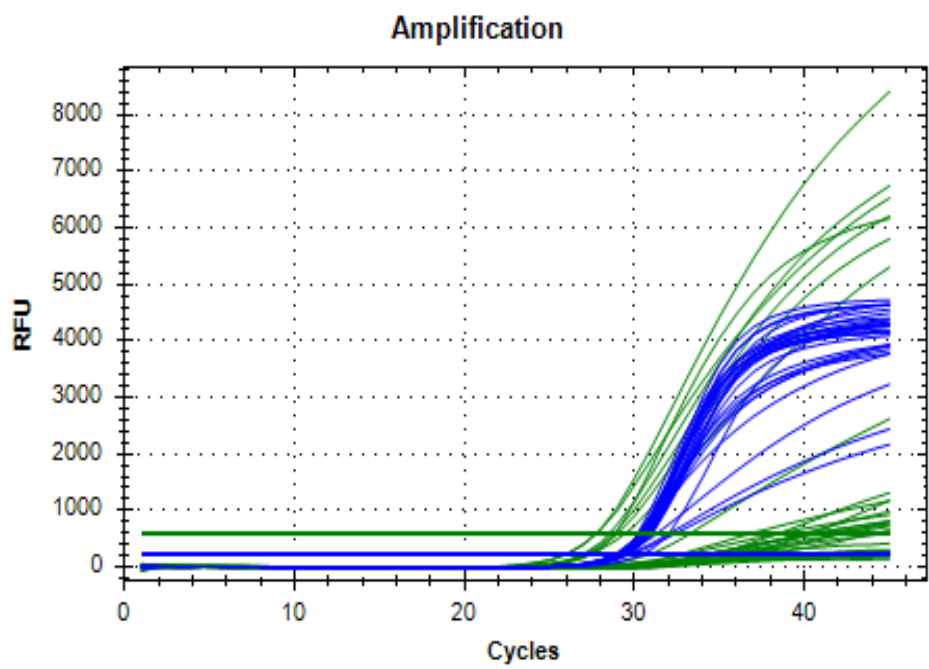


Figura 5. Risultati real-time PCR kit B semola di grano duro fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Tabella 40. Risultati real-time PCR kit C semola di grano duro fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit C POS se Ct<40 cicli LOD 0.5 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	non valido
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	negativo
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	non valido

<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	non valido
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	non valido
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d’Abissinia	non valido
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	non valido
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	non valido

non valido: controllo interno di amplificazione negativo

Tabella 41. Risultati real-time PCR kit D semola di grano duro fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	kit D POS se Ct<35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	25.04
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	25.3
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	34.38

<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	34.34
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	31
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	31.2
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	negativo

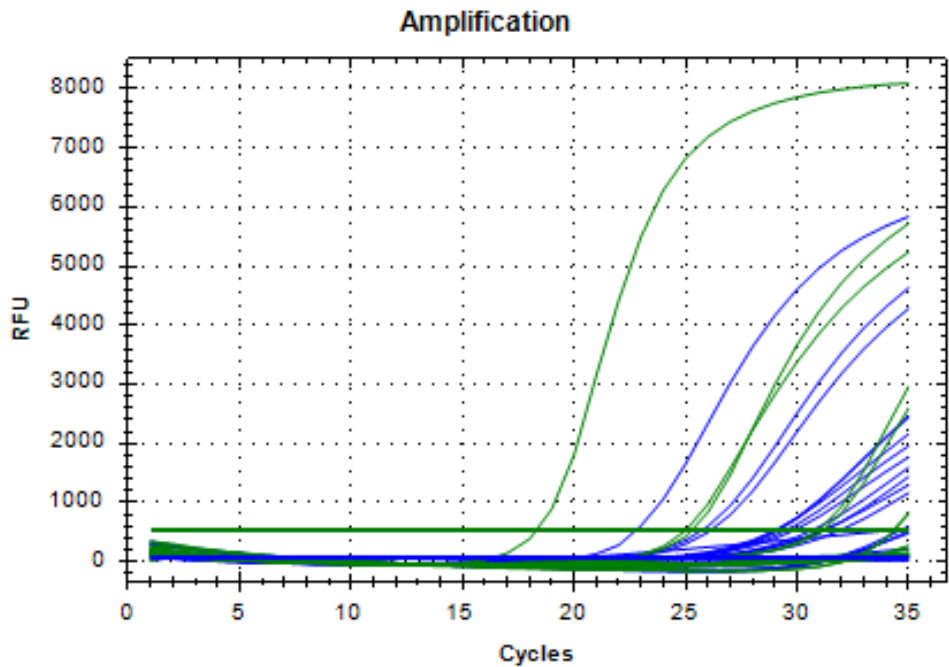


Figura 6. Risultati real-time PCR kit D semola di grano duro fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

I risultati ottenuti per i campioni spiked con i target *Sinapis alba* 10 ppm, *Sinapis nigra* 10 ppm e *Sinapis juncea* 10 ppm e *Sinapis arvensis* 10 ppm sono riportati in Tabella 42, Tabella 43, Tabella 44, e Tabella 45.

Tabella 42. Risultati campioni spiked con *Sinapis alba* 10 ppm

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Semola grano duro Spike 10 ppm	24.68	28.42	non valido	25.04
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Semola grano duro Spike 10 ppm	24.71	28.66	negativo	25.3

<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Semola grano duro Spike 10 ppm	23.85	28.94	negativo	non eseguito
---------------------	---------------	-----------------------------------	-------	-------	----------	--------------

Tabella 43. Risultati campioni spiked con *Sinapis nigra* 10 ppm

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Semola grano duro Spike 10 ppm	23.01	negativo	negativo	negativo
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Semola grano duro Spike 10 ppm	23.16	negativo	non valido	negativo
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Semola grano duro Spike 10 ppm	23.05	negativo	non valido	non eseguito

Tabella 44. Risultati campioni spiked con *Sinapis juncea* 10 ppm.

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Semola grano duro Spike 10 ppm	22.78	negativo	negativo	negativo
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Semola grano duro Spike 10 ppm	22.55	negativo	negativo	negativo
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Semola grano duro Spike 10 ppm	22.68	negativo	negativo	non eseguito

Tabella 45. Risultati campioni spiked con *Sinapis arvensis* certificata 10 ppm

Specie target	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Semola grano duro Spike 10 ppm	22.36	negativo	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Semola grano duro Spike 10 ppm	30.45	negativo	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Semola grano duro Spike 10 ppm	22.81	33.16	negativo	non eseguito

I risultati ottenuti per i campioni spiked con gli untarget *Brassica napus* 500 ppm, *Brassica oleracea* 500 ppm, *Brassica rapa* 500 ppm, *Brassica carinata* 500 ppm e *Raphanus sativus* 500 ppm sono riportati in Tabella 46, Tabella 47, Tabella 48, Tabella 49 e Tabella 50.

Tabella 46. Risultati campioni spiked con *Brassica napus* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm

<i>Brassica napus</i>	Colza	Semola grano duro Spike 500 ppm	32.97	negativo	negativo	34.38
<i>Brassica napus</i>	Colza	Semola grano duro Spike 10 ppm	33.22	negativo	negativo	34.34
<i>Brassica napus</i>	Colza	Semola grano duro Spike 10 ppm	33.04	negativo	negativo	non eseguito

Tabella 47. Risultati campioni spiked con *Brassica oleracea* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Semola grano duro Spike 500 ppm	32.65	negativo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Semola grano duro Spike 500 ppm	32.57	negativo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Semola grano duro Spike 500 ppm	33.07	negativo	negativo	non eseguito

Tabella 48. Risultati campioni spiked con *Brassica rapa* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Semola grano duro Spike 500 ppm	30.89	negativo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Semola grano duro Spike 500 ppm	30.78	negativo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Semola grano duro Spike 500 ppm	30.86	negativo	negativo	non eseguito

Tabella 49. Risultati campioni spiked con *Brassica carinata* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm
<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d'Abissinia	Semola grano duro Spike 500 ppm	17.46	27.62	negativo	31
<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d'Abissinia	Semola grano duro Spike 500 ppm	16.96	29.32	non valido	31.2
<i>Brassica carinata</i>	Cavolo d'Abissinia	Semola grano duro Spike 500 ppm	17.17	27.68	non valido	non eseguito

Tabella 50. Risultati campioni spiked con *Raphanus sativus* 500 ppm

Specie untarget	Nome comune	Matrice	kit A	kit B	kit C	kit D
			POS se Ct <35 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct <35 cicli LOD 0.4 ppm	POS se Ct <40 cicli LOD 0.5 ppm	POS se Ct < 35 cicli LOD 5 ppm

<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello	Semola grano duro Spike 500 ppm	32.75	negativo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello	Semola grano duro Spike 500 ppm	32.53	negativo	non valido	negativo
<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello	Semola grano duro Spike 500 ppm	32.78	negativo	non valido	non eseguito

I risultati dei campioni spiked con i target (10ppm) e con gli untarget (500ppm), ottenuti mediante end-point PCR con il kit E, sono riportati nella Tabella 51.

Tabella 51. Risultati end-point PCR kit E semola di grano duro fortificata con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm

Specie	Nome comune	I coppia primers: BraF/BraR 270bp	II coppia di primers: BnjF/BnjR 300bp	III coppia di primers: SalF/SalR 250bp
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	positivo	negativo	positivo
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	positivo	negativo	positivo
<i>Sinapis alba</i> (target)	Senape bianca	positivo	negativo	positivo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis nigra</i> (target)	Senape nera	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis juncea</i> (target)	Senape bruna	positivo	positivo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	positivo	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	positivo	negativo	negativo
<i>Sinapis arvensis</i> (target)	Senape selvatica	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica napus</i> (untarget)	Colza	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica oleracea</i> (untarget)	Cavolo	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica rapa</i> (untarget)	Rapa	positivo	negativo	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	positivo	positivo	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	positivo	positivo	negativo
<i>Brassica carinata</i> (untarget)	Cavolo d'Abissinia	positivo	positivo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo



<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo
<i>Raphanus sativus</i> (untarget)	Ravanello	positivo	negativo	negativo

**Capitolo 9. Risultati spiked samples in ELISA**

**9.1 Valutazione delle prestazioni analitiche del test ELISA sulla matrice farina di grano tenero integrale**

Preliminarmente allo studio sui campioni spiked, sulla matrice di farina di grano tenero integrale verificata come negativa, è stata effettuata mediante i kit ELISA G, H, I, L una verifica di alcuni parametri analitici (LOD, LOQ) su 12 aliquote indipendenti. Allo stato di avanzamento della ricerca è stato possibile verificare la congruenza delle prestazioni analitiche del LOD e del LOQ ottenuti con le specifiche dichiarate dal produttore per tutti i kit selezionati.

Per quanto riguarda i campioni spiked testati con tecnica ELISA, i risultati sono riportati nella Tabella 52 e Tabella 53.

Tabella 52. Esiti verifica prestazioni KIT ELISA G, H, I, L farina di grano tenero integrale

				G		H		I		L	
Specie target	Nome comune	Matrice		Dichiarato	esito	Dichiarato	esito	Dichiarato	esito	Dichiarato	esito
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Farina grano tenero Spike 10 ppm	LOD	0,04 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO
			LOQ	0,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Farina grano tenero Spike 10 ppm	LOD	0,04 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO
			LOQ	0,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Farina grano tenero Spike 10 ppm	LOD	0,04 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO
			LOQ	0,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Brassica napus</i>	Colza	Farina grano tenero Spike 500 ppm	LOD	0,04 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO
			LOQ	0,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Farina grano tenero Spike 500 ppm	LOD	0,04 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO
			LOQ	0,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Brassica rapa</i>	Rapa	Farina grano tenero Spike 500 ppm	LOD	0,04 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO
			LOQ	0,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	

Brassica carinata	Cavolo d'Abissinia	Farina grano tenero Spike 500 ppm	LOD	0,04 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO
			LOQ	0,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
Raphanus sativus	Ravanello	Farina grano tenero Spike 500 ppm	LOD	0,04 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	1,3 ppm	VERIFICATO
			LOQ	0,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		Positivo	

Tabella 53. Esiti verifica prestazioni KIT ELISA M, N, O, P farina di grano tenero integrale

				M		N		O		P	
Specie target	Nome comune	Matrice		Dichiarato	esito	Dichiarato	esito	Dichiarato	esito	Dichiarato	esito
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Farina grano tenero integrale Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO	positivo		positivo		positivo		positivo	
			SPIKE								
<i>Brassica napus</i>	Colza	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO	positivo		positivo		positivo		positivo	
			SPIKE								
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO	positivo		positivo		positivo		positivo	

			SPIKE								
Brassica rapa	Rapa	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO	positivo		positivo		positivo		positivo	
			SPIKE								
Brassica carinata	Cavolo d'Abissinia	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO	positivo		positivo		positivo		positivo	
			SPIKE								
Raphanus sativus	Ravanello	Farina grano tenero integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO	positivo		positivo		positivo		positivo	
			SPIKE								

## **9.2 Valutazione delle prestazioni analitiche del test ELISA sulla matrice semola di grano duro integrale**

Successivamente, per quanto riguarda la matrice semola di grano duro integrale selezionata, sono state condotte le analisi in ELISA e i risultati ottenuti sui campioni spiked sono riportati in Tabella 54.

CRENARIA e ISS

Tabella 54. Esiti verifica prestazioni KIT ELISA M, N, O, P semola di grano duro integrale

				M		N		O		P	
Specie target	Nome comune	Matrice		Dichiarato	esito	Dichiarato	esito	Dichiarato	esito	Dichiarato	esito
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Semola grano duro integrale Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Brassica napus</i>	Colza	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO	positivo				positivo			

			SPIKE								
Brassica rapa	Rapa	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
Brassica carinata	Cavolo d'Abissinia	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
Raphanus sativus	Ravanello	Semola grano duro integrale Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO	positivo		positivo		positivo		positivo	



### **9.3 Valutazione delle prestazioni analitiche del test ELISA sulla matrice semola di grano duro**

Infine, per quanto riguarda la matrice semola di grano duro selezionata, sono state condotte le analisi in ELISA e i risultati ottenuti sui campioni spiked sono riportati in Tabella 55.

CRENARIA e ISS

Tabella 55. Esiti verifica prestazioni KIT ELISA M, N, O, P semola di grano duro

				M		N		O		P	
Specie target	Nome comune	Matrice		Dichiarato	esito	Dichiarato	esito	Dichiarato	esito	Dichiarato	esito
<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca	Semola grano duro Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis nigra</i>	Senape nera	Semola grano duro Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis juncea</i>	Senape bruna	Semola grano duro Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Sinapis arvensis</i>	Senape selvatica	Semola grano duro Spike 10 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Brassica napus</i>	Colza	Semola grano duro Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
<i>Brassica oleracea</i>	Cavolo	Semola grano duro Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO

			ESITO	positivo				positivo			
			SPIKE								
Brassica rapa	Rapa	Semola grano duro Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
Brassica carinata	Cavolo d'Abissinia	Semola grano duro Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO SPIKE	positivo		positivo		positivo		positivo	
Raphanus sativus	Ravanello	Semola grano duro Spike 500 ppm	LOD	1 ppm	VERIFICATO	< 1 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO	0,5 ppm	VERIFICATO
			LOQ	2 ppm	VERIFICATO	2,5 ppm	VERIFICATO	2 ppm	VERIFICATO	1 ppm	VERIFICATO
			ESITO	positivo		positivo		positivo		positivo	

## Capitolo 10. Discussione e valutazione dei risultati

### 10.1 Discussione dei risultati

L'obiettivo generale dello studio condotto dal gruppo di lavoro è stato quello di mettere a punto e descrivere un protocollo per valutare le performance dei test analitici basati sulla biologia molecolare (Polymerase Chain Reaction - PCR) e sulle tecniche immunoenzimatiche (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) per la ricerca dell'allergene senape in prodotti della filiera cerealicola, mediante sperimentazione comparativa delle due metodiche. Allo stato attuale, le due tecniche risultano quelle più comunemente utilizzate nella maggior parte dei laboratori: mediante la tecnica ELISA è possibile rilevare la presenza di proteine potenzialmente allergizzanti mentre in PCR è possibile rilevare la presenza di DNA di una specie allergenica.

Al fine del raggiungimento dell'obiettivo, il progetto è stato articolato nelle seguenti fasi: 1) coordinamento e programmazione attività, 2) censimento dei test commerciali, 3) definizione del protocollo di verifica delle performance e selezione dei test, 4) reperimento delle matrici da analizzare, 5) esecuzione delle prove sperimentali, 6) stesura della presente relazione.

Nello specifico, considerate le diverse fasi del progetto, la maggiore criticità riscontrata è stata la selezione di matrici blank: come previsto in fase di progettazione, infatti, il reperimento nel settore della molitura di campioni cerealicoli che diano risultati negativi alla presenza di senape è risultato molto difficoltoso. Inizialmente, i test sperimentali effettuati sulle matrici blank hanno reso possibile l'individuazione di una farina di grano tenero integrale negativa alla presenza di senape, sia in PCR che in ELISA, con la quale è stato possibile condurre le successive analisi per la verifica delle performance dichiarate dai kit (LOD, LOQ). Successivamente, considerata la difficoltà di reperimento di ulteriori matrici blank ed a seguito di uno studio condotto per la verifica della negatività, è stato possibile selezionare dal commercio due campioni, uno di semola di grano duro integrale e uno di semola di grano duro. Le due matrici così individuate sono state impiegate per produrre le matrici fortificate con i target e gli untarget con le quali sono stati condotti gli studi PCR ed ELISA per la verifica delle performance dei kit commerciali (LOD, LOQ). Le concentrazioni dei target, pari a 10 ppm, sono state scelte dal gruppo di lavoro in modo tale da essere compatibile con tutti i LOD teorici dichiarati dai kit; per gli untarget sono state considerate concentrazioni maggiori, pari a 500 ppm, al fine di garantire una eventuale rilevazione da parte dei test utilizzati e quindi evidenziare le potenziali cross-reattività.

Per quanto riguarda la ricerca dei target attraverso l'utilizzo dei 5 kit real-time PCR indicati, sono stati ottenuti risultati soddisfacenti. In particolare, i kit real-time PCR A, B e D hanno mostrato una buona sensibilità rilevando la specie target *Sinapis alba* (10 ppm), e, in alcune repliche, anche le specie target *Sinapis nigra* e/o *Sinapis juncea* analizzate (10 ppm); contrariamente il kit C si è dimostrato meno sensibile determinando le *Sinapis* a concentrazioni maggiori: 100 ppm (*Sinapis alba*, *Sinapis nigra*) o 500 ppm (*Sinapis juncea*). Relativamente al target *Sinapis arvensis* (senape selvatica) inizialmente sono state effettuate prove preliminari in acqua ultra-pura, che evidenziano la capacità dei kit real-time PCR A e kit B di rilevarlo ad una concentrazione finale pari a 10 ppm. Risultati analoghi sono stati successivamente ottenuti analizzando con gli stessi kit i campioni di grano tenero integrale, di semola di grano duro integrale e di semola di grano duro fortificati con *Sinapis arvensis* di provenienza certificata a 10 ppm. Il kit real-time PCR C si è dimostrato meno sensibile determinando *Sinapis arvensis* a 100 ppm.

Relativamente alla detection degli untarget, il kit real-time PCR A ha mostrato valori di Ct superiori a 35 cicli in due repliche di *Brassica oleracea*, risultate quindi negative nella farina grano tenero integrale. Il kit real-time PCR B non ha rilevato la presenza di *Brassica oleracea* (in tutte e tre le matrici), *Brassica napus* (nella semola di grano duro integrale e nella semola di grano duro), *Brassica rapa* (nella semola di grano duro), *Brassica carinata* (in 1 replica nella semola di grano duro integrale) e *Raphanus sativus* (in quasi tutte le repliche eseguite nelle tre matrici). Il kit

real-time PCR C ha mostrato risultati negativi o non validi nella quasi totalità delle repliche testate. Infine, il kit real-time PCR D non ha rilevato la presenza di *Brassica napus* (nella farina di grano tenero integrale), *Brassica oleracea* (nella farina di grano tenero integrale e nella semola di grano duro), *Brassica rapa* (in quasi tutte le repliche eseguite nelle tre matrici), *Brassica carinata* (in 1 replica nella farina grano tenero integrale) e *Raphanus sativus* (in 1 replica nella farina grano tenero integrale e in 2 repliche nella semola di grano duro). I risultati ottenuti mostrano quindi che l'approccio in biologia molecolare è in grado di discriminare correttamente gli untarget dai target, nonostante la stretta correlazione dal punto di vista filogenetico. Relativamente alle cross reattività evidenziate dallo studio, si ritiene che un miglioramento delle performance dei metodi biomolecolari potranno essere ottenute attraverso il disegno e la sintesi di nuovi primer e sonde in grado di appaiare solo ed esclusivamente le sequenze delle specie del genere *Sinapis* escludendo il genere *Brassica*. Infine, il kit E, costituito da 3 end-point PCR, ha mostrato risultati analoghi a quelli ottenuti mediante real-time PCR, risultando però agevolmente applicabile solo in determinate realtà laboratoristiche richiedendo tempi di esecuzione più lunghi rispetto ad altri test (utilizza più set di primer impiegati singolarmente e necessita di corsa elettroforetica per la visualizzazione dei risultati), e non essendo disponibile ad oggi come test commerciale pronto all'uso.

Per quanto riguarda le analisi mediante test ELISA è stata confermata la positività sia della matrice farina di grano tenero integrale fortificata con i target *Sinapis alba*, *Sinapis nigra*, *Sinapis juncea* e *Sinapis arvensis* (10 ppm) utilizzando 8 differenti kit (G, H, I, L, M, N, O, P); gli stessi kit hanno evidenziato una cross-reattività con tutti gli untarget analizzati, quali *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica carinata* e *Raphanus sativus* (500 ppm). I kit ELISA M, N, O, P impiegati per le analisi delle matrici semola di grano duro integrale e semola di grano duro fortificate con i target a 10 ppm e con gli untarget a 500 ppm hanno mostrato risultati analoghi a quelli ottenuti per la matrice farina di grano tenero integrale.

## 10.2 Considerazioni e conclusioni

Il presente studio, condotto attraverso una stretta e proficua collaborazione tra CReNaRiA, ISS e portatori di interesse del settore agroalimentare e molitorio, atto a definire un protocollo analitico applicabile sia a metodi biomolecolari che immunoenzimatici, ha previsto a livello laboratoristico i seguenti step: 1) la verifica della negatività delle matrici a disposizione da usare come blank, mediante l'esecuzione di sessioni analitiche in PCR ed in ELISA; 2) la verifica della sensibilità/limite di rilevabilità (LOD) dei test, attraverso l'esecuzione di sessioni analitiche su matrici contaminate con i target di interesse alle concentrazioni ritenute congrue; 3) la verifica del parametro specificità per ciascun test, con valutazione della performance di esclusività sulle principali *Brassicaceae* di interesse per il settore della cerealicoltura e della molitura.

Per quanto riguarda lo step 1 è stata verificata la negatività delle matrici rese disponibili per lo studio. A questo scopo sono state condotte delle prove su matrici alimentari con caratteristiche merceologiche differenti (farina di grano tenero, semola di grano duro, integrale e non integrale), rappresentative delle diverse categorie di prodotti cerealicoli presenti in commercio, in modo da riprodurre situazioni reali di un laboratorio di analisi su tale tipologia alimentare. Volendo inoltre considerare se la matrice potesse influenzare le performance dei test in termini di sensibilità, soprattutto in relazione alla fase di estrazione del DNA dei target, si è scelto di utilizzare tre protocolli, differenziati in base all'esistenza di metodi di estrazione forniti dalle ditte produttrici dei kit PCR (kit A e kit B) o secondo la ISO 21571:2013 (kit C, kit D, kit E). Alla luce dei risultati ottenuti non sono state osservate differenze significative nelle risposte analitiche effettuate sulle matrici testate che appaiono quindi, sebbene differenti dal punto di vista merceologico e tecnologico, equiparabili in termini di matrici analitiche.

Relativamente allo step 2, per quanto riguarda la verifica della sensibilità, i valori dei LOD riscontrati risultano essere compatibili con i valori riportati nei dossier di validazione interni forniti dalle ditte produttrici dei kit sottoposti a valutazione e con l'attuale situazione normativa ad oggi in vigore a livello internazionale, per cui non è stato fissato un criterio quantitativo per l'allergene senape. Per la tutela del consumatore allergico, un approccio metodologico combinato che preveda l'applicazione di tecniche analitiche differenti, PCR-based e ELISA-based, permette una maggiore attendibilità del risultato analitico ed è applicabile a metodi qualitativi, con possibile impiego anche ai metodi quantitativi.

In merito allo step 3, il presente protocollo ha valutato la selezione e l'impiego dei target e degli untarget su cui effettuare le prove di ottimizzazione e di validazione al fine di verificare la specificità delle metodiche ed eventuali cross-reattività.

Per quanto riguarda i metodi immunoenzimatici, tutti i kit ELISA impiegati in questo studio hanno confermato una elevata similarità delle proteine allergeniche (antigeni) presenti negli estratti dei campioni. Seguendo le modalità sperimentali previste dal protocollo proposto, la reattività crociata degli anticorpi riscontrata indica la necessità da parte dei laboratori di un approfondimento atto a valutare la possibilità di stabilire una concentrazione al di sopra della quale sia possibile discriminare, al di là di ragionevole dubbio, la presenza di senape.

Per quanto riguarda i metodi basati sulla biologia molecolare, alcuni kit real-time PCR hanno evidenziato positività verso le *Brassicaceae* target (genere *Sinapis*) e, in alcuni casi, verso una o più *Brassicaceae* interferenti (genere *Brassica*), confermando che, nonostante la stretta correlazione dal punto di vista filogenetico delle specie appartenenti alla famiglia delle *Brassicaceae*, alcuni test PCR sono in grado di discriminare le specie. Tra gli untarget è bene sottolineare inoltre che la specie *Brassica carinata*, in quanto ibrido tra *Sinapis nigra* e *Brassica oleracea*, è stata identificata con la maggior parte dei test utilizzati.

Alla luce dei risultati ottenuti, sulla base dell'approccio analitico definito in questo studio come modello della verifica delle performance delle tecniche immunoenzimatiche e di biologia molecolare, il protocollo di validazione del metodo (schematizzato nell'allegato 2) risulta essere trasferibile ai laboratori operanti nel settore degli allergeni alimentari. Il suddetto protocollo è applicabile oltre che alle granaglie e prodotti della molitura anche ad altre matrici alimentari complesse come i prodotti da forno e di pasticceria, gli alimenti ready-to-eat, i prodotti a base di carne e i prodotti lattiero-caseari; inoltre può essere impiegato per rilevare la presenza di allergeni alimentari sia di origine vegetale (quali arachide, mandorla, lupino, soia e sedano), che di origine animale (quali crostacei e molluschi). Tale protocollo, oltre a supportare le aziende e i laboratori nella scelta del test più appropriato per le proprie esigenze, permette di definire le prove sperimentali da effettuare in laboratorio per lo studio di validazione, la valutazione e la verifica delle prestazioni analitiche sulle matrici di interesse e di comune reperimento.



DIPARTIMENTO  
SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE  
E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA



**CReNaRiA** TORINO  
Centro di Riferenza Nazionale per la rilevazione negli alimenti  
di sostanze e prodotti che provocano allergie o intolleranze

Allegato 1

ID	KIT	TIPO DI SAGGIO	DITTA	Plate format	MATRICI VALIDAZIONE	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Conversion factor	LOQ protein (mg/kg)	RANGE DI QUANTIFICAZIONE (ppm)	Precisione (CV%)	RECUPERO (%)	CROSS-REATTIVITA'	note
1	RIDASCREEN® FAST Senf/Mustard n. R6152	Sandwich ELISA	R-Biopharm	48	sausages, ketchup, soya sauce, minced meat	0,1	0,5	0,3	0,15	0,5-13,5	CV % medio intra-saggio: 2,8; CV% medio inter-saggio: 9,7	91,1-109,8	Rapeseed 67 %	lettura OD 450 nm
2	AlerTox ELISA Mustard	Sandwich ELISA	Eurolab SafeFood Hygiene	96	sausage, salad sauce, canned soup, instant soup, cheese and mixed herbs	1,5	2	0,33	0,6	2-50	CV % medio intra-saggio: 9; CV% medio inter-saggio: 12,9	76-98	Brown mustard (seed) 59%, Black mustard (seed) 50%, Charlock mustard 48%, Rapeseed 59%	lettura OD 450 nm
3	SENSISpec Mustard ELISA	Sandwich ELISA	Eurofins Tecna	96	sausage, salad sauce, tinned soup, instant soup, cheese and mixed herbs	1	2	0,32	0,64	2-60	CV intra-saggio: 5,7-13,3% (CV % medio 8,3%); CV inter-saggio: 9,4-17,8% (CV% medio 12,3%)	76-98	Black mustard (seed) 50%, Brown mustard (seed) 59%, Charlock mustard 48%, Rapeseed 59%	lettura OD 450 nm (reference wavelength 620 nm)
4	Mustard ELISA kit	Sandwich ELISA	Arigo Bio (DBA Italia)	96	sausage, dressings, soups, cheese and mixed herbs	1	2	non dichiarata	non dichiarata	2-60	CV % intra-saggio: 8 %; CV% inter-saggio: 12%	76-98	rapeseed 15,5%, Radish seed 31,2%, Cabbage seed 29,2%, Brown mustard 26,5%, Black mustard 32,5%	lettura OD 450 nm
5	MUSTARD Allergen-Check™ ELISA	Sandwich ELISA	KAIRoSafe Srl (Bio-Check)	48/96	dairy & meat products, soups, sauces and herbs – and environmental swabs	1	2	0,25	0,5	2-50	CV % intra-saggio: 5,7-13,3 %; CV% inter-saggio: 9,4-17,8%	76-98	Black (32,5%) and brown (26,5%) mustard seed, cabbage seed (29,2%), caraway (0,0012%), cardamom (0,006%), coriander (0,012%), cumin =,0003%, field mustard (160%), garden cress (0,0009), garden cress seed (1,5%), horseradish (0,0007%), radish seed (31,2%) and rape seed (15,5%)	Il kit viene venduto nel formato da 48 pozzetti e da 96 pozzetti.
6	VERATOX FOR MUSTARD ALLERGEN	Sandwich ELISA	Neogen	48	non dichiarata	< 1	2,5	0,26	0,652	2,5 - 25	CV % intra-saggio: 4,1 %; CV% inter-saggio: 3,5 %	75-102	This test cross-reacts with seeds from the Brassicaceae family (e.g., rapeseed and broccoli seed) due to their similarity in structure to mustard protein.	microwell reader with a 650 nm filter
7	AGRAQUANT ALLERGEN - MUSTARD	Sandwich ELISA	Romer Labs	48	tinned soup, salad souce, cheese, sausage, instant soup, mixed herbs	1	2	0,18	0,36	2-60	CV % intra-saggio tra 6,0 e 13,3% CV% intra-saggio medio 8,3%; CV% inter-saggio tra 9,4 e 17,8% CV% inter-saggio medio 12,3%	76-98	Black mustard 50%, brown mustard 59%, charlock mustard (arvensis) 48% and rapeseed 59%	I valori di cross reattività sono stati determinati con alimento in purezza trattato come campione
8	AGRAQUANT ALLERGEN - MUSTARD - PLUS	Sandwich ELISA	Romer Labs	48	ketchup, bread, potato, salad, mayonnaise, sald cream, biscuit, soya, spread, curry	0,5	1	0,12	0,12	1-25	CV % intra-saggio 8,8 a 14,3%; CV% inter-saggio: 5,8%	97-167 (116)	Rapeseed 100%, yellow mustard 200%, black mustard 100%, brown mustard 50%	Fattori di conversione: Black mustard seeds 1; brown mustard seed 2; yellow mustard seed 0,5

ID	KIT	TIPO DI SAGGIO	DITTA	MATRICI VALIDAZIONE	LOD (ppm)	CROSS-REATTIVITA'	note
1	RT PCR.SPECIALFINDER MUSTARD MC	Real-Time PCR	GENERON	Prodotti da forno e da pasticceria Granagli e prodotti della molitura Alimenti ready to eat Prodotti lattiero caseari Prodotti a base di carne	LOD 0.5 mg senape/kg Determinato in matrice	<i>Sinapis alba</i> (POS) <i>Sinapis nigra</i> (POS) <i>Sinapis juncea</i> (POS) <i>Sinapis arvensis</i> (POS) <i>Brassica napus</i> (NEG) <i>Brassica rapa</i> (NEG) <i>Brassica oleracea</i> (NEG) <i>Brassica carinata</i> (POS) <i>Raphanus sativus</i> (NEG) <i>Arabidopsis thaliana</i> (not tested)	Sonde: FAM HEX Kit da 50 reazioni
2	SureFood Allergen Mustrad	Real-Time PCR	R BIOPHARM	Pure Formaggio Carni Salse farine (farro, segale, miglio, grano)	LOD 0.4 mg senape/kg determinato con quantard40	<i>Sinapis alba</i> (POS) <i>Sinapis nigra</i> (POS) <i>Sinapis juncea</i> (POS) <i>Sinapis arvensis</i> (POS) <i>Brassica napus</i> (NEG) <i>Brassica rapa</i> (NEG) (NEG) <i>Brassica oleracea</i> (NEG) <i>Brassica carinata</i> (POS) <i>Raphanus sativus</i> (not tested) <i>Arabidopsis thaliana</i> (not tested)	Sonde: FAM VIC/HEX Kit da 100 reazioni
3	MUSTARDKIT REALTIMEPCR	Real-Time PCR	4LAB	Non dichiarata	LOD: 1 COPIA GENOMICA 0.5 pg di DNA senape (non è specificato il denominatore né se da matrice o in acqua) Da esempio in report si evince 5 ppm	<i>Sinapis alba</i> (POS) <i>Sinapis nigra</i> (not tested) <i>Sinapis juncea</i> (not tested) <i>Sinapis arvensis</i> (not tested) <i>Brassica napus</i> (not tested)) <i>Brassica rapa</i> (not tested) <i>Brassica oleracea</i> (NEG) <i>Brassica carinata</i> (not tested) <i>Raphanus sativus</i> (NEG) <i>Arabidopsis thaliana</i> (not tested)	Sonde: FAM JOE Kit da 50 reazioni
4	Qualyfast® Mustard	Real-Time PCR	Bioside	bakery products, processed meat, chocolate, flours	LOD 0.5 mg senape/kg Determinato in matrice	<i>Sinapis alba</i> (POS) <i>Sinapis nigra</i> (POS) <i>Sinapis juncea</i> (not tested) <i>Sinapis arvensis</i> (not tested) <i>Brassica napus</i> (not tested)) <i>Brassica rapa</i> (not tested) <i>Brassica oleracea</i> (not tested) <i>Brassica carinata</i> (not tested) <i>Raphanus sativus</i> (not tested) <i>Arabidopsis thaliana</i> (not tested)	Sonde: HEX FAM CY5 Kit da 96 reazioni
5	Metodo FEM2 Ambiente	End-point PCR	Merk illustra™	farina bio, pasta, falafel, quinoa, hamburger, impanatura, cracker, biscotti, spezie, semi	LOD <i>Brassicaceae</i> 2 mg/kg. LOD <i>Sinapis alba</i> 10 mg/kg. LOD <i>Sinapis nigra</i> e <i>Sinapis juncea</i> 20 mg/kg	<i>Sinapis alba</i> (POS) <i>Sinapis nigra</i> (POS) <i>Sinapis juncea</i> (POS) <i>Sinapis arvensis</i> (not tested) <i>Brassica napus</i> (POS) <i>Brassica rapa</i> (not tested) <i>Brassica oleracea</i> (not tested) <i>Brassica carinata</i> (not tested) <i>Raphanus sativus</i> (not tested) <i>Arabidopsis thaliana</i> (not tested)	PuReTaq RTG PCR