



---

## **Identificazione di Alimenti Irradiati: prime esperienze con il DNA Comet Assay, metodo biologico di screening - Identification of Irradiated Food: preliminary experiences with DNA Comet Assay, a biological method of screening**

*Rondini C., Zampa S., Ramistella L., Pierboni E.*

---

**Abstract.** The problem of the radiant treatments, applied to market foods is examined (purpose, modality, normative, effects, methods of identification). Is then illustrated the analytical control of radiated food by means of the DNA Comet Assay, a screening method standardised in Europe. This method, initially setted up in Laboratory with the purpose of research, is here outlined and the first results are shown and commented. It will be further developed, optimized and validated and soon be used in expected by official plans controls. After this preliminary analysis, every "not negative" sample, it will be subjected to chemical and/or physical tests for confirmation by the Centro Nazionale di Referenza for the Radioactivity Research in the Veterinary field and animal breeding.

**Riassunto.** La problematica dei trattamenti radianti, applicati ad alimenti destinati alla commercializzazione, viene esaminata nei suoi aspetti principali (finalità, modalità, normative, effetti, metodi di identificazione); viene poi illustrato l'approccio al controllo analitico degli Alimenti Irradiati effettuato mediante il DNA Comet Assay, metodo di screening standardizzato e normato in Europa. Tale metodo, inizialmente messo a punto in Laboratorio con finalità di studio e di ricerca, viene brevemente descritto ed i primi risultati ottenuti vengono mostrati e commentati. Esso sarà ulteriormente sviluppato, ottimizzato e validato, quanto prima sarà utilizzato per i controlli previsti dai Piani Ufficiali; ogni campione, risultato non negativo in seguito a questa analisi preliminare, sarà poi sottoposto alle opportune prove chimiche e/o fisiche di conferma presso il Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico Veterinario (CRNR).

---

### **Introduzione**

Finalità dei trattamenti irradianti - L'irraggiamento degli alimenti non è un'invenzione recente, venne studiato per eliminare i batteri dagli alimenti addirittura fin dagli anni '20 e da tempo è utilizzato dalla NASA (1999) per i pasti degli astronauti durante le missioni spaziali. Nella realtà oggi a noi più vicina, le derrate alimentari possono essere trattate con radiazioni ionizzanti prima dell'immissione in commercio, non solo allo scopo di prolungarne la conservazione grazie all'inibizione dello sviluppo di specie microbiche responsabili del deterioramento, ma anche, nel caso in cui si tratti di organismi vegetali, di controllare i processi di maturazione, germinazione e invecchiamento. L'irraggiamento può anche prevenire e/o eliminare, nel contempo, lo sviluppo di specie patogene ed infestanti, limitando le facili contaminazioni crociate da cui originano gran parte delle infezioni e tossinfezioni alimentari. Questi trattamenti hanno come obiettivo primario, pertanto, quello di garantire la maggior sicurezza e qualità degli alimenti, attraverso una riduzione della diffusione di rischi; è assolutamente doveroso ricordare, comunque, che essi non possono mai sostituire le norme di "buona pratica di manifattura e produzione" (GMP). Modalità ed effetti del trattamento - Generalmente, vengono utilizzate sorgenti di radiazioni gamma ( $\gamma$ ) come il Cobalto ( $^{60}\text{Co}$ ), o il Cesio ( $^{137}\text{Cs}$ ), oppure raggi X o elettroni emessi da sorgenti

artificiali attivate; il processo può avvenire soltanto in impianti autorizzati e l'esposizione avviene con modalità e dosi controllate che possono variare a seconda del tipo di alimento o di effetto desiderato (da 0,05 KGy\*, dose minima utile per l'inibizione della germogliazione, fino a 50 KGy, dose massima utilizzata per sterilizzare alimenti destinati a diete per soggetti immunodepressi. \* = il Gy (gray) è l'unità di misura della dose assorbita e corrisponde ad un assorbimento di 1 Joule per kg di prodotto trattato.

La dose per l'irraggiamento in campo alimentare non deve superare i 10 KGy; a questo livello infatti, negli alimenti non vengono prodotte modifiche apprezzabili sul piano nutrizionale ed organolettico; inoltre, studi condotti congiuntamente dall'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura, l'Agenzia Internazionale per l'Energia Atomica e l'Organizzazione Mondiale della Sanità (FAO/AIEA/OMS), hanno dimostrato che non vengono indotte modifiche di tipo microbiologico, tossicologico, nutrizionale o mutagenico. L'irraggiamento modifica gli organismi a livello molecolare; alcune alterazioni, come la frammentazione delle catene di DNA, sono simili a quelle prodotte da trattamenti come il congelamento e lo scongelamento. Normative - In base al Decreto Ministeriale del 30 agosto 1973, fin d'allora, in Italia, sono autorizzati alla commercializzazione agli, patate e cipolle, irradiati al fine di bloccare la germinazione e, dal 1996, anche spezie, erbe e condimenti vegetali; la Legge 94 del 2001 inoltre, accogliendo le Direttive dell'Unione Europea 1999/2/CE e 1999/3/CE, permette l'irraggiamento anche per cibi il cui trattamento è permesso in altri paesi dell'UE. In tutti i casi, l'avvenuto irraggiamento deve essere correttamente dichiarato in etichetta e può essere apposto sulla confezione un apposito simbolo\*\*.



Figura 1. Simbolo "Radura"

\*\* = "Radura" è il simbolo internazionale (CODEX-STAN 2005) degli alimenti irradiati, è generalmente verde e raffigura una pianta dentro un cerchio; la parte superiore del cerchio è tratteggiata, i dettagli grafici ed i colori variano a seconda della nazione. La parola "Radura" deriva da "radurizzazione", un termine nuovo che combina le lettere iniziali di "radiazione" ed il termine latino "durus", che significa "resistente".

Metodi di identificazione - Fin dai primi anni '90, programmi di ricerca internazionali hanno sviluppato vari metodi analitici per identificazione degli alimenti irradiati; i più affidabili, scelti sulla base di criteri tecnici e pratici di valutazione, sono poi stati validati. Dal 1996 il Comitato Europeo di Normazione (CEN) ne ha standardizzati 10 (CEN: European Standards adopted as CODEX Methods), di tipo biologico e microbiologico, chimico e fisico, usati come metodi di screening o di conferma.

<b>Tabella 1 - Metodi di identificazione standardizzati CEN</b>			
<b>Standard</b>	<b>Alimenti</b>	<b>Tipo</b>	<b>Metodo</b>
EN 1784:2003	Alimenti contenenti grasso (pollo, maiale e manzo, camembert, avocado, papaya e mango)	Chimico (C)	Gascromatografia (GC) degli idrocarburi
EN 1785:2003	Alimenti contenenti grasso (pollo e maiale, uova)	Chimico (C)	GC/Spettrometria di massa (MS) di 2-alchilciclobutanoni
EN 1786:1996	Alimenti contenenti ossa (pollo, manzo, trote)	Fisico (C)	Spettroscopia di Risonanza di Spin Elettronico (ESR)
EN 1787:2000	Alimenti contenenti cellulosa (pistacchi, paprika, fragole)	Fisico (C)	ESR
EN 1788:2001	Alimenti contenenti minerali silicei (erbe, spezie, gamberetti, patate, frutta e vegetali)	Fisico (C)	Termoluminescenza (TL)
EN 13708:2001	Alimenti contenenti zucchero	Fisico (C)	ESR
EN 13783:2001	Erbe e spezie	Microbiologico (S)	microrganismi totali / microrganismi vivi (metodi DEFT/APC)
EN 13784:2001	Alimenti contenenti DNA (vari tipi di carni, semi, frutta secca e spezie)	Biologico (S)	DNA Comet Assay
EN 13751:2002	Erbe e spezie, molluschi e crostacei	Fisico (S)	Luminescenza fotostimolata (PSL)
EN 14569:2004	Carne di pollo	Microbiologico (S)	LAL test/conta gram negativi
Legenda: (S) = Metodo di Screening; (C) = Metodo di Conferma			

Allo stato attuale è evidente che non esiste un metodo generale applicabile a tutti i tipi di alimenti irradiati, ma metodiche specifiche per matrici alimentari diverse.

### **L'esperienza del Laboratorio**

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) dell'Umbria e delle Marche partecipa in qualità di Unità Operativa (U.O.) partner, dal mese di gennaio 2009, al Progetto Ordinario di Ricerca Finalizzata 2007 dal titolo: "Sviluppo, Validazione e applicazione di Metodi Chimici, Fisici e Biologici per l'Identificazione di Alimenti Irradiati e Valutazione della Dose"; il progetto è di durata biennale, è finanziato dal Ministero della Salute e ne è capofila l'IZS della Sicilia. In questo primo anno di attuazione del Progetto, sulla base degli obiettivi previsti, l'impegno di questa U. O., in particolare del Laboratorio Organismi Geneticamente Modificati, è stato concentrato nella messa a punto ed ottimizzazione del Metodo Biologico di Screening denominato DNA Comet Assay, standardizzato nella norma EN 13784:2001, recepita da UNI nel 2002. Trattandosi di un'attività analitica di nuova implementazione per l'Istituto, prima di tutto è stata dedicata particolare

attenzione alla formazione del Personale. Infatti, come annunciato nel corso della prima Riunione di Progetto, tenutasi a Palermo il 27 marzo 2009, un Collaboratore Tecnico Sanitario ha effettuato un apposito tirocinio di formazione e addestramento, della durata di due giorni (26-27 marzo), presso il Laboratorio Tecnologie Acidi Nucleici applicate agli Alimenti, Reparto Microbiologia, Sede Centrale di Brescia, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), ove la prova viene eseguita da tempo (Agnelli E. et al, 2004). Subito dopo, tenendo conto sia delle modalità della prova descritte nella norma, sia delle particolarità viste ed apprese, è stata redatta una prima bozza di protocollo del metodo, distribuita a tutti i partecipanti al progetto.

Tale esperienza formativa ha permesso inoltre di procedere, con probabilità minime di errore, all'acquisto delle apparecchiature mancanti, dei consumabili e dei reagenti necessari per la corretta esecuzione della prova; ha infine consentito la definizione dei criteri da applicare nelle fasi di un'oculata valutazione e scelta del software per elaborazione di immagini. Può verificarsi infatti, in seguito ad un'interpretazione soltanto visuale e soggettiva dei preparati, di incorrere in errore ed esprimere un falso risultato positivo; con l'ausilio di un software dedicato come quelli attualmente in commercio, invece, si è in grado di circoscrivere ed eliminare in gran parte il background e le eventuali aspecificità che possono di volta in volta presentarsi; esso è quindi di notevole aiuto, poiché consente maggiore oggettività dell'interpretazione, aumentando l'affidabilità del risultato.

Pertanto, dopo aver effettuato una ricognizione dei programmi informatici creati per questa applicazione, reperibili in commercio ed usati nei Laboratori che utilizzano questo metodo analitico, si è effettuata una prima valutazione in base alla compatibilità con le apparecchiature già presenti e disponibili (microscopio a fluorescenza, sistema di acquisizione e camera, tutte dotazioni del Modulo Istologia del Laboratorio Diagnostica di Base dell'IZSUM, che ne ha concesso l'utilizzo). Successivamente, con la collaborazione del Servizio Informatico dell'Istituto, le "demo" gratuite di tali programmi sono state installate in un PC avente le opportune caratteristiche; sono state così fatte varie prove, sono stati messi a confronto il buon funzionamento, la semplicità d'uso ed i costi. Infine è stata data la preferenza al software Komet 6.0 (Andor Technology), che è stato acquistato dall'azienda distributrice italiana autorizzata (Lot Oriel), installato ed attivato.

## **Materiali e Metodi**

Principio del metodo - Poiché uno degli effetti provocati dalle radiazioni ionizzanti è la frammentazione del DNA, questa può essere evidenziata mediante un'elettroforesi di cellule isolate su gel, ove i frammenti, estratti dal nucleo delle cellule per effetto del campo elettrico, migrano formando una coda caratteristica che ricorda quella di una cometa, la cui lunghezza sarà funzione della dose di radiazioni impiegata.

Campioni - Il DNA Comet Assay è stato eseguito su matrici carnee (muscolo) appartenenti alle specie pollo e maiale, casi in cui il metodo è già validato a livello europeo; a breve saranno analizzati anche muscoli di tacchino e di bovino ed in un prossimo futuro il metodo sarà messo a punto anche su matrici vegetali.

I campioni sin qui utilizzati per questo Progetto di Ricerca non hanno subito trattamenti radianti e sono stati reperiti presso l'IZSUM stesso, grazie alla collaborazione di alcune Articolazioni Organizzative interne (Diagnostica di Base, Contaminanti Biologici, Autocontrollo), sono stati suddivisi in aliquote e immediatamente congelati a -20°C. E' stato sottoposto a prova anche un campione di pollo (non irradiato) inviato congelato dall'IZSSI (previa omogeneizzazione e

frazionamento) a ciascuna delle Unità Operative; questo, inizialmente, doveva essere inviato soltanto alle U.U. O.O. che, per questo Progetto, eseguono prove di tipo chimico e fisico, poi, in seguito a richiesta, è stato inviato anche all'IZSUM. Il campione, del peso di 500 grammi in totale, è stato sempre mantenuto alla temperatura di congelamento di  $-20^{\circ}\text{C}$ . Non essendo stato possibile sino ad oggi reperire dal commercio matrici carnee dalla cui etichetta si possa risalire ad un trattamento irradiante, da utilizzare quindi come campioni positivi, si è "simulato", tramite shock termico, il danno prodotto al DNA dell'alimento dall'irraggiamento. A tale scopo, aliquote degli stessi campioni sono state scongelate a T ambiente, poi mantenute a  $+4^{\circ}\text{C}$  per 24 ore, infine riportate a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; anche queste aliquote, completato il ricongelamento, sono state sottoposte a DNA Comet Assay.

Modalità di esecuzione della prova - Le prime fasi del DNA Comet Assay consistono nella preparazione di una sospensione monocellulare dall'alimento in esame in una soluzione di agarosio a basso punto di fusione (Low Gelling Point) ed in una corretta distribuzione delle cellule stesse su vetrino, prerivestito (Precoating) con uno strato di agarosio. Successivamente le cellule vengono lisate, in modo da consentire la fuoriuscita del DNA dal nucleo, poi sottoposte a corsa elettroforetica. Infine, i preparati vengono colorati con arancio di acridina (fluorocromo specifico per il DNA) ed osservati immediatamente al microscopio a fluorescenza; l'immagine viene fotografata con apposita fotocamera, acquisita ed archiviata. La valutazione di una eventuale degradazione del DNA viene effettuata su un numero complessivo di 100 nuclei per campione. Elaborazione ed interpretazione dei risultati - Le immagini, osservate ad un ingrandimento totale 100X, vengono catturate ed acquisite utilizzando la fotocamera collegata ad un computer, in cui è installato un programma di acquisizione. Per ogni campione in esame vengono contati in totale 100 nuclei cellulari e questi vengono analizzati mediante il software Komet 6.0. Esso valuta 24 parametri strutturali della cometa, tra cui i più significativi per questa prova sono: l'area della testa (percentuale di DNA rimasto nel nucleo cellulare), l'area della coda (percentuale di DNA migrato), il rapporto tra area della testa e della coda, infine la distanza tra la testa e il centro di massa del DNA presente nella coda. Il software calcola infine la differenza di intensità di fluorescenza, misurata in pixel, tra il background (sfondo), che viene preso come riferimento e l'intensità della fluorescenza emessa dalla molecola di DNA, attribuendo dei valori-soglia di luminosità diversi per la testa, la coda e l'area totale della cellula.

## **Risultati**

In quasi nessun campione non irradiato di pollo e di maiale, se congelato e mai scongelato, è stata rilevata degradazione di DNA cellulare; nei nuclei lisati delle cellule, infatti, al termine della corsa elettroforetica, il DNA si presentava integro e compatto (Fig. 2) e non si evidenziavano le caratteristiche immagini delle "code di cometa", dovute alla fuoriuscita di acido nucleico non più integro, ma frammentato per effetto del trattamento irraggiante.

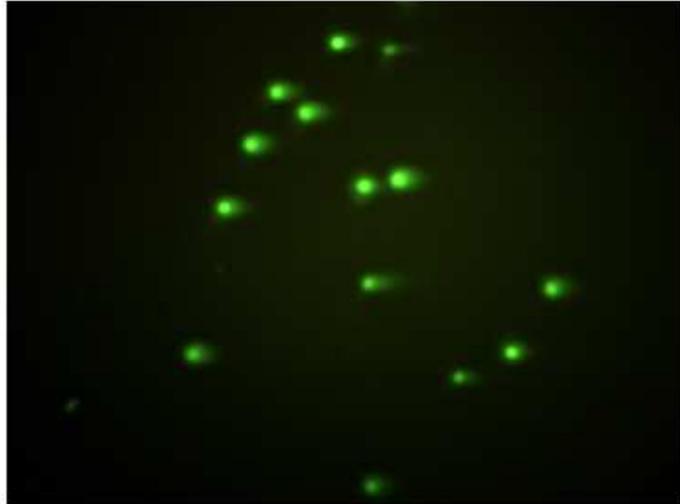


Figura 2. Nuclei da cellule di muscolo di maiale non irradiato, campione congelato

Il campione di muscolo di pollo che era stato omogeneizzato prima del congelamento si è invece dimostrato non idoneo per l'esecuzione della prova: è risultato caratterizzato, infatti, da un considerevole background e da materiale non differenziato (Fig. 3); molto probabilmente la fase preliminare di omogeneizzazione a cui era stato sottoposto, adatta per le prove chimiche e fisiche eseguite dalle altre Unità Operative partecipanti al Progetto, non è compatibile con un'esigenza fondamentale del DNA Comet Assay, cioè la disponibilità di matrici che permettano di ottenere una buona risoluzione di cellule singole isolate.

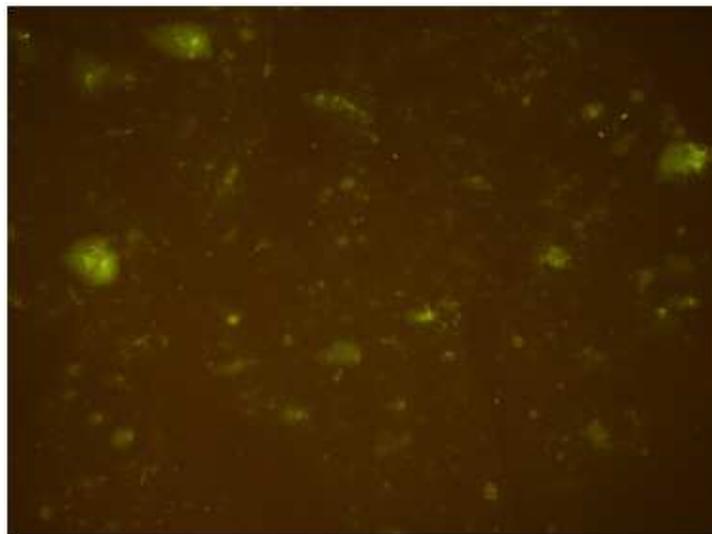


Figura 3. Nuclei da cellule di muscolo di pollo non irradiato, campione omogeneizzato prima del congelamento.

Le aliquote che erano state sottoposte alle fasi di scongelamento/ricongelamento, infine, hanno ben simulato l'effetto di un trattamento radiante, mostrando una degradazione del DNA delle singole cellule; infatti, insieme a rari nuclei con DNA quasi integro, è stato possibile osservare molti nuclei da cui il DNA era degradato e fuoriuscito completamente, dando luogo sia alle "code di cometa" che ai cosiddetti "ghost", figure simili, ma ancora più distanti dai nuclei di partenza.

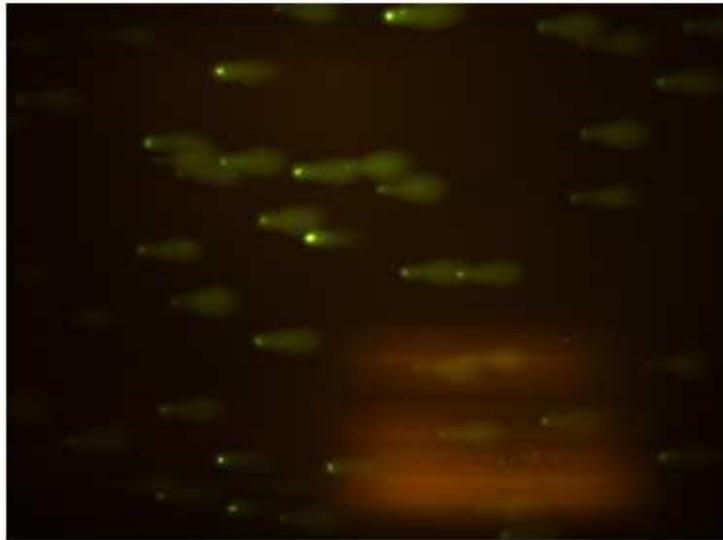


Figura 4. Nuclei di cellule di muscolo di maiale non irradiato, campione scongelato e ricongelato.

### Conclusioni

Il DNA Comet Assay è un metodo di Screening per l'identificazione di alimenti irradiati semplice, economico e veloce; merita comunque una riflessione: mentre è praticamente impossibile ottenere un falso risultato negativo, soltanto una grande esperienza o un opportuno supporto informatico permettono di distinguere alcune aspecificità da un probabile risultato positivo; per questo motivo è molto importante avere a disposizione un software che permetta di riconoscere, segregare ed eliminare tutti, o quasi tutti, i "falsi valori". Ancora più importante, anzi fondamentale, sarà la disponibilità di materiali di riferimento positivi che ancora non esistono, al punto che i Laboratori si devono adattare ad utilizzare a tal fine campioni appositamente trattati, oppure risultati positivi alle prove di conferma.

Per sopperire a tale mancanza, questa Unità Operativa ha contattato l'unica azienda italiana autorizzata ad effettuare trattamenti irradianti (Gammarad), la quale si è dichiarata disponibile ad irraggiare alcune matrici alimentari per finalità di ricerca; si è ora al punto di dover definire eventuali modalità di trasporto e trattamento dei campioni. Nel mese di gennaio 2010, inoltre, è stato richiesto ufficialmente al Centro di Riferenza di Foggia l'invio di alcuni campioni di muscolo, sia irradiati a una dose predefinita di KGy che non irradiati, tutti congelati e non omogeneizzati, con i quali, effettuato il numero necessario e sufficiente di prove, si riesca a definire un "valore-soglia" effettivo, rigorosamente calcolato e difficilmente confutabile. Saranno infine sottoposti a prova anche campioni irradiati che, come previsto dall'attività del Progetto di Ricerca Finalizzata, saranno inviati entro l'anno 2010 dall' U.O. capofila. Fatto ciò, la validazione delle prove, per le matrici "muscolo di pollo e di maiale", potrebbe considerarsi praticamente completa. Attualmente, è in fase avanzata di redazione una procedura che conterrà alcune modifiche ed aggiunte rispetto alla bozza iniziale; tali variazioni saranno dovute essenzialmente all'esperienza maturata dal Laboratorio ed all'utilizzo del software; la versione definitiva sarà del tutto conforme alle regole del Sistema Qualità in vigore presso l'IZSUM.

## Bibliografia

"Space food and nutrition" - NASA, An Educator's Guide With Activities in Science and Mathematics, EG-1999-02-115-HQ • 11 Food  
p.10 - [http://www.nasa.gov/pdf/190546main\\_SFN\\_Introduction.pdf](http://www.nasa.gov/pdf/190546main_SFN_Introduction.pdf)

CODEX-STAN - 1 (2005) labelling of prepacked food - p. 6  
[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/32/CXS\\_001e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/32/CXS_001e.pdf)

CEN: "European Standards adopted as CODEX Methods":  
<http://www.cen.eu/cen/Sectors/Sectors/Food/Pages/European%20Standards%20adopted%20as%20CODEX%20Methods.aspx> 4) Rapporto ISTISAN 04/21 -  
<http://www.iss.it/binary/publ/publi/0421.1106229815.pdf>

Agnelli E., Maccabiani G., D'Abrosca F., Tilola M., Pavoni E., Piro R., Bertasi B., Losio M. N. , Boni P. (2004). Applicabilità del "Comet Assay" a diverse tipologie di alimenti irradiati. *Industrie Alimentari*, vol. 43, no440, pp. 1009-1013.

## Ringraziamenti

Si ringraziano: la Dott.ssa Annamaria Di Noto (IZS Sicilia) per il coinvolgimento come U.O. partner nel Progetto di Ricerca Finalizzata; le Dott.sse Marina Nadia Losio, Eva Agnelli e Barbara Bertasi, (IZS Lombardia ed Emilia Romagna), per l'accoglienza e la formazione impartita; il Dr. Eugenio Chiaravalle e il Dr. Michele Mangiacotti (CRNR, IZS Puglia e Basilicata) per i campioni irradiati; il Dr. Giovanni Pezzotti, la Dott.ssa Stefania Scuota e il Dr. Guerriero Mencaroni (IZS Umbria e Marche) per i campioni negativi; il Dr. Vincenzo Grelloni e la Dr.ssa Elisabetta Manuali (IZSUM) per l'utilizzo del microscopio a fluorescenza. Si ringrazia infine il Dr. Nicola Violetta e tutto il Settore Informatico dell'IZSUM, per la preziosa consulenza ed il tempo dedicato alle lunghe fasi di installazione, attivazione, prova e confronto dei vari software per l'analisi ed elaborazione delle immagini.



Identification of Irradiated Food: preliminary experiences with DNA Comet Assay, a biological method of screening - Identificazione di Alimenti Irradiati: prime esperienze con il DNA Comet Assay, metodo biologico di screening by Rondini C. et al. is licensed under a [Creative Commons Attribuzione 2.5 Italia License](http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/it/). Based on a work at [spvet.it](http://spvet.it). Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	<b>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy</b>
<b>Centralino Istituto</b>	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047
<b>Biblioteca</b>	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: <a href="mailto:bie@izsum.it">bie@izsum.it</a>
<b>Rivista SPVet.it</b> ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: <a href="mailto:editoria@izsum.it">editoria@izsum.it</a> <a href="http://spvet.it">http://spvet.it</a> / <a href="http://indice.spvet.it">http://indice.spvet.it</a>
<b>U. R. P.</b>	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: <a href="mailto:URP@izsum.it">URP@izsum.it</a>