



---

## Studio di validazione del DNA comet assay, metodo di screening per l'identificazione di alimenti irradiati - Validation study of the "DNA comet assay", a screening method for the irradiated foods identification

*Zampa S., Curcio L., Pierboni E., Haouet M. N., Rondini C.*

---

**Abstract.** The DNA Comet Assay, or Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE), is a screening method used to detection of irradiated food. In this study it was performed on irradiated and non irradiated chicken, pork and bovine muscle tissue to establish which measurement(s), recorded by use of the software Komet 6.0, are most significantly correlated with DNA damage. The parameters: Olive Tail Moment (OTM), Tail Extent Moment (TEM), Tail Length and Tail/Head (or L/H; Tail Extent/Head Extent ratio), gave a good correlations that were not significantly different from each other. The TEM is the best parameter useful for method validation.

**Riassunto.** Il DNA Comet Assay, tecnica microelettroforetica per la diretta visualizzazione del danno al DNA in singole cellule, è un metodo analitico di screening per l'identificazione di alimenti trattati con radiazioni ionizzanti, noto anche come "single cell gel electrophoresis" (SCGE). Il metodo analitico oggetto di studio è stato applicato su tessuti muscolari irradiati e non irradiati di pollo, di maiale e di bovino per stabilire quali misure, definite mediante l'utilizzo di un apposito software (Komet 6.0), siano più significative per rilevazione del danno al DNA. I parametri Olive Tail Moment (OTM), Tail Extent Moment (TEM), Tail Length ed il rapporto Tail/Head (o L/H; Tail Extent/Head Extent), hanno mostrato una buona correlazione e non sono risultate differenze statisticamente significative tra loro. Il TEM è risultato il miglior parametro utilizzabile per la definizione dei valori-soglia necessari alla validazione del metodo.

---

### Introduzione

L'irraggiamento con raggi  $\gamma$ , raggi X o elettroni, effettuato in opportune condizioni e dosi, viene utilizzato per prolungare i tempi di conservazione e garantire la salubrità di alimenti di origine vegetale o animale, in quanto ne rallenta i processi di maturazione e germinazione, evita la moltiplicazione di parassiti, la crescita e lo sviluppo di batteri, anche patogeni, con i relativi conseguenti effetti negativi sulla salute. In campo alimentare la dose di radiazioni non deve superare i 10 KGy, affinché non vengano prodotte variazioni apprezzabili sul piano nutrizionale ed organolettico; l'irraggiamento comunque modifica gli organismi a livello molecolare, producendo alcune alterazioni come la frammentazione delle catene di DNA, simile a quella provocata da shock termico. Per l'identificazione degli alimenti irradiati, dal 1996 il Comitato Europeo di Normazione (CEN) ha standardizzato 10 metodi (1), di tipo biologico, microbiologico, chimico e fisico, di cui 4 sono usati come metodi di screening, 6 come conferma. Nel presente lavoro, il metodo biologico denominato "DNA Comet Assay" è stato applicato su tessuto muscolare di pollo, di maiale e di bovino; si tratta di un metodo semplice (2), economico, veloce e sensibile, ma non specifico, per cui soltanto una grande esperienza o un opportuno supporto informatico permettono di distinguere alcune aspecificità da un probabile risultato positivo. Nell'identificazione degli alimenti irradiati questo tipo di analisi è quindi utilizzata in fase di screening e gli eventuali risultati positivi devono essere confermati con un metodo standardizzato mirato, poiché la degradazione e la frammentazione del DNA possono essere prodotte anche da altri tipi di trattamenti chimici e fisici. Per questo motivo, al fine di evitare il più possibile eventuali false positività ed inutili e costose conferme analitiche, si è ritenuto di fondamentale importanza utilizzare un software dedicato, studiare e realizzare una validazione del metodo stabilendo un valore soglia di positività, al fine di eliminare tutti, o quasi tutti, i "falsi valori" positivi.

## Materiali e Metodi

*Matrici Alimentari* - Sono stati processati in totale 300 campioni. Di questi, 120 erano di tessuto muscolare di maiale, suddivisi in: 30 campioni non irradiati (N.I.) e 90 campioni (3 gruppi da 30) irradiati con raggi X di bassa energia (d.d.p. 150kV) a diverse dosi: 0,15 KGy, 1 KGy e 3 KGy. Altri 90 campioni consistevano in tessuto muscolare di pollo, di cui: 30 N.I., 30 irradiati ad 1 KGy e gli altri 30 irradiati a 3 KGy. Infine, per il tessuto muscolare di bovino, sono stati esaminati altri 90 campioni, che sono stati suddivisi come appena descritto per il pollo.

*DNA Comet Assay* - Il metodo eseguito è conforme a quello riportato nella Norma UNI EN 13874:2002. Brevemente, si preparano sospensioni monocellulari del tessuto muscolare in esame in una soluzione di agarosio allo 0,8% a basso punto di fusione (Low Gelling Point) e le cellule ottenute vengono distribuite su vetrini prerivestiti (Precoating) con uno strato di agarosio 0,5%. Successivamente, le cellule vengono lisate per consentire la fuoriuscita del DNA dal nucleo e sottoposte a corsa elettroforetica. Infine i preparati sono colorati con arancio di acridina (fluorocromo specifico per il DNA) ed immediatamente osservati, per evidenziare le eventuali "comete" di DNA degradato, al microscopio ottico a fluorescenza (Leica, modello DMR Fluo HC; ingrandimento 100 X).

*Acquisizione ed elaborazione delle immagini* - Le immagini sono state catturate mediante telecamera (Nikon, modello DS 5 MC) ed acquisite mediante il programma Nis-Elements F2.30 (Nikon). Per ogni campione in esame sono stati contati in totale 100 nuclei cellulari, elaborati mediante il software Komet 6.0 (@Andor Technology - Formerly Kinetic Imaging) (3, 4, 5). Al fine di normalizzare la curva di distribuzione dei dati, sono stati elaborati complessivamente 9.000 dati per il tessuto muscolare di pollo, 12.000 per il maiale e 9.000 per il bovino.

Il software di analisi computerizzata delle immagini "Komet 6.0" prende in esame ben 34 parametri differenti, dei quali non tutti sono significativi; ad esempio l'area della cometa, così come quelle della testa e della coda, sono estremamente variabili, quindi non sono considerate ai fini della valutazione statistica; lo stesso vale per altri parametri che non sono stati oggetto della messa a punto del metodo. Infatti, il programma "Komet 6.0" divide i parametri in due categorie: nella prima, inserisce quelli che derivano dalla valutazione "globale" del profilo della cometa; nella seconda, raggruppa le misurazioni geometriche e densitometriche "pure", calcolate per tutte le componenti del profilo esaminato, fornendo i dati quantitativi necessari alla valutazione dettagliata della cometa.

**A) Tail length (TL).** Questo parametro misura la distanza di migrazione del DNA dal nucleo cellulare. La dose di irradiazione provoca rotture singole e/o doppie della catena del DNA, più piccoli sono i frammenti del DNA, maggiore sarà la lunghezza della coda; la causa è da ricondursi al loro basso peso molecolare, che permette una rapida migrazione verso l'anodo durante l'elettroforesi. Al contrario, quando il DNA non ha subito danni, se sottoposto ad un campo elettrico si muove molto lentamente, pertanto il nucleo cellulare appare intatto e con una coda ridotta. I seguenti parametri si avvalgono del "moment", questo si riferisce alla capacità del software di normalizzare l'intensità della fluorescenza e di ridurre eventuali interferenze, misurando esclusivamente l'intensità della fluorescenza emessa che è direttamente proporzionale al danno cellulare.

**B) Tail Extent Moment (TEM).** Questo prende in esame i margini dell'immagine, destro e sinistro, e ne valuta l'intensità di fluorescenza (secondo il moment) in relazione ad un valore soglia della coda (Tail Threshold). Esso misura la differenza d'intensità di fluorescenza, misurata in pixel, tra il background, che viene preso come riferimento e l'intensità della fluorescenza emessa dalla molecola

di DNA, attribuendo dei valori-soglia di luminosità divisi per la testa, la coda e l'area totale della cellula.

**C) Olive Tail Moment (OTM).** E' una misurazione globale della coda la cui intensità è normalizzata attraverso il moment.

**D) Tail Extent/Head Extent (o L/H).** Tale parametro rapporta l'estensione della coda e l'estensione della testa.

### Risultati e discussione

I 30.000 dati ottenuti analizzando 300 campioni di tessuto muscolare di maiale, pollo e bovino sono stati utilizzati per calcolare la media, la deviazione standard ed il valore soglia superiore (media+2DS) ed inferiore (media-2DS). In base ai valori soglia ottenuti per i quattro parametri considerati (TL, TEM, OTM, L/H; tabelle 1, 2 e 3), sono stati verificati tutti i dati dei campioni oggetto della validazione, sia quelli veramente positivi che quelli veramente negativi (N.I.). Dai risultati ottenuti sono state calcolate la specificità, la sensibilità e l'accuratezza (tabelle 4, 5 e 6).

<b>Tabella 1. Media, DS, Media±2 DS dei parametri valutati per il tessuto muscolare di maiale a differenti dosi di irraggiamento</b>					
<b>Miale</b>		<b>TL</b>	<b>TEM</b>	<b>OTM</b>	<b>L/H</b>
N.I.	Media	76,02	18,83	15,76	1,13
	DS	21,73	5,75	4,13	0,19
	Media+2DS	119,47	30,34	24,02	1,51
0,15 KGy	Media	173,80	64,77	32,25	2,49
	DS	19,26	13,55	5,77	0,28
	Media+/-2DS	212,31/135,29	91,88/37,66	43,79/20,71	3,06/1,93
1 KGy	Media	220,35	100,61	48,41	3,03
	DS	40,36	29,65	12,59	0,4
	Media+2DS	301,08	159,92	73,59	3,84
3 KGy	Media	255,86	124,37	61,22	3,1
	DS	29,53	20,34	9,25	0,23
	Media+2DS	314,92	165,06	79,71	3,56

<b>Tabella 2. Media, DS, Media±2 DS dei parametri valutati per il tessuto muscolare di pollo a differenti dosi di irraggiamento</b>					
<b>Pollo</b>		<b>TL</b>	<b>TEM</b>	<b>OTM</b>	<b>L/H</b>
N.I.	Media	97,37	29,73	22,98	1,49
	DS	10,11	5,55	2,67	0,15
	Media + 2DS	117,58	48,83	28,31	1,78

(- segue -)

1 KGy	Media	198,78	90,92	45,99	2,80
	DS	256	7,09	5,34	0,11
	Media+/-2DS	203,90/193,67	105,10/76,75	56,66/ 35,32	3,02/2,57
3 KGy	Media	238,68	125,82	62,91	3,18
	DS	5,46	2,28	2,23	0,08
	Media+2DS	249,60	130,38	67,37	3,33

<b>Tabella 3. Media, DS, Media±2 DS dei parametri valutati per il tessuto muscolare di bovino a differenti dosi di irraggiamento</b>					
<b>Bovino</b>		<b>TL</b>	<b>TEM</b>	<b>OTM</b>	<b>L/H</b>
N.I.	Media	132,92	31,23	19,84	1,63
	DS	12,52	6,57	3,21	0,14
	Media + 2DS	157,96	44,37	26,26	1,92
1 KGy	Media	200,73	75,60	41,29	2,33
	DS	13,27	8,78	4,59	0,04
	Media+/-2DS	227,28/174,18	93,17/58,03	50,47/32,10	2,41/2,26
3 KGy	Media	259,73	150,02	69,30	4,42
	DS	5,46	6,76	2,02	0,23
	Media+2DS	270,66	163,54	73,34	4,89

<b>Tabella 4. Performance del tessuto muscolare di maiale</b>			
<b>Maiale</b>	<b>Specificità</b>	<b>Sensibilità</b>	<b>Accuratezza</b>
L/H	100%	98,89%	99,17%
	IC % 0,00	IC % 2,21	IC % 1,92
TEM	100%	98,89%	99,17%
	IC % 0,00	IC % 2,21	IC % 1,92
OTM	76,67%	100%	94,17%
	IC % 15,44	IC % 0,00	IC % 4,94
TL	96,67%	98,89%	98,38%
	IC % 6,55	IC % 2,21	IC % 2,70

<b>Tabella 5. Performance del tessuto muscolare di pollo</b>			
<b>Pollo</b>	<b>Specificità</b>	<b>Sensibilità</b>	<b>Accuratezza</b>
L/H	100%	93,33%	95,56%
	IC % 0,00	IC % 6,44	IC % 5,32

(- segue -)

TEM	100%	95,00%	96,67%
	IC % 0,00	IC % 5,63	IC % 4,63
OTM	100%	97,67%	97,78%
	IC % 0,00	IC % 4,63	IC % 3,81
TL	100%	88,33%	92,22%
	IC % 0,00	IC % 8,29	IC % 6,92

<b>Tabella 6. Performance del tessuto muscolare di bovino</b>			
<b>Bovino</b>	<b>Specificità</b>	<b>Sensibilità</b>	<b>Accuratezza</b>
L/H	100%	78,33%	85,56%
	IC % 0,00	IC % 10,64	IC % 9,08
TEM	100%	93,33%	95,56%
	IC % 0,00	IC % 6,44	IC % 5,32
OTM	100%	93%	95,56%
	IC % 0,00	IC % 6,44	IC % 5,32
TL	96,67%	100%	98,89%
	IC % 6,55	IC % 0,00	IC % 2,71

I valori di specificità, sensibilità ed accuratezza sono risultati statisticamente accettabili per tutti i parametri in tutte le tipologie di tessuto muscolare. Il TEM si mostra comunque migliore per la rilevazione del danno al DNA cellulare indotto dal trattamento con radiazioni ionizzanti sui tessuti muscolari testati; è stato quindi scelto come parametro indicatore del valore soglia da utilizzare nello studio di validazione del metodo.

Il valore Media -2 DS dell'intervallo TEM, alla dose di irraggiamento più bassa per i vari tessuti muscolari (0,15 KGy per il maiale; 1KGy per il pollo e per il bovino) definisce il valore soglia per la rilevazione della degradazione di DNA cellulare.

Grazie all'utilizzo del software Komet 6.0, come si può evincere dalle figure 1, 2 e 3, non sono risultati falsi valori positivi sui tessuti muscolari non irradiati, né falsi valori negativi su quelli irradiati alle dosi più alte; si è registrata invece una percentuale di circa 8% di falsi negativi alla dose di irraggiamento più bassa (Figure 1, 2 e 3).

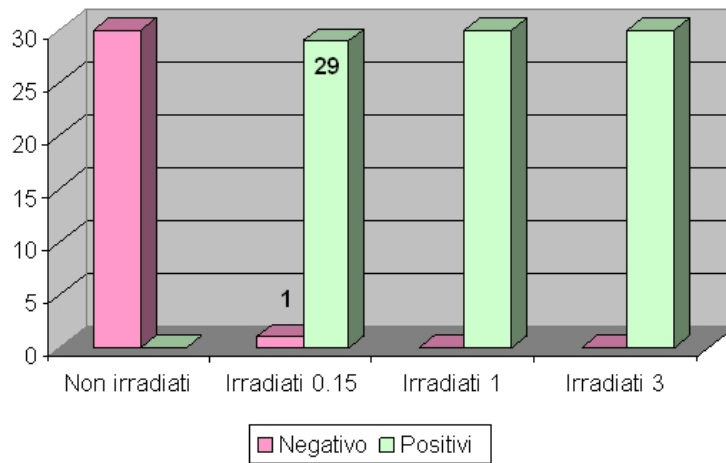


Figura 1. Risultati ottenuti sulla tessuto muscolare di maiale in riferimento al parametro TEM

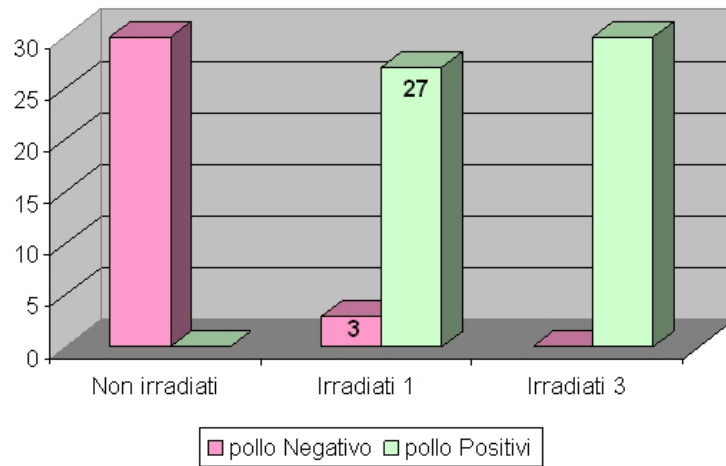


Figura 2. Risultati ottenuti sulla tessuto muscolare di pollo in riferimento al parametro TEM

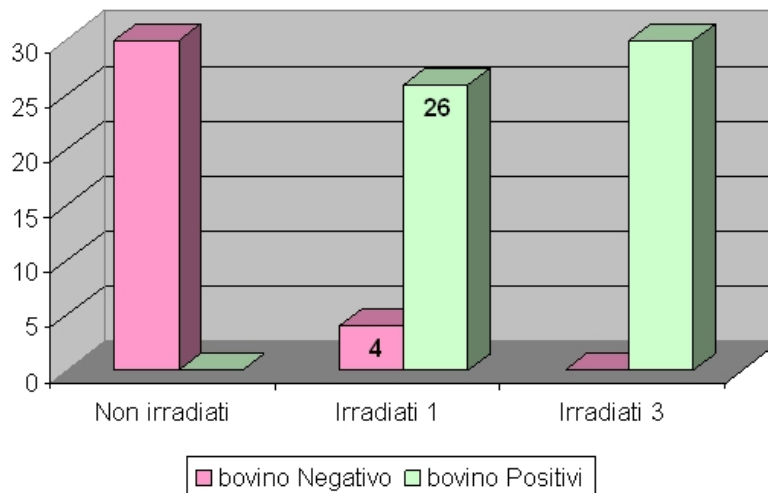


Figura 3. Risultati ottenuti sulla tessuto muscolare di pollo in riferimento al parametro TEM

L'interpretazione dei dati ottenuti in funzione del TEM, e la conseguente espressione dei risultati in un rapporto di prova emesso dal Laboratorio, sono quindi le seguenti:

- Se il valore medio TEM è inferiore al valore Media-2DS, il campione è considerato negativo; in un rapporto di prova il risultato viene espresso come "degradazione di DNA cellulare non rilevata" ed è definitivo;
- Se il valore medio TEM è superiore al valore Media+2DS, il campione è considerato positivo; nel rapporto di prova il risultato viene espresso come "degradazione di DNA cellulare rilevata" ed il campione va in conferma;
- Se il valore medio TEM è compreso tra il valore Media-2DS / Media+2DS, il campione è considerato dubbio, ma nel rapporto di prova il risultato viene comunque espresso come "degradazione di DNA cellulare rilevata", in quanto il campione deve essere ulteriormente analizzato con un metodo di conferma.

### **Conclusioni**

Le performances del DNA Comet Assay, utilizzato per la fase di screening nella rilevazione di alimenti irradiati, sono state ottimizzate nella fase di interpretazione ed elaborazione delle immagini, mediante l'impiego del software dedicato che fornisce parametri significativamente correlabili alla frammentazione del DNA. Il presente studio di validazione ha consentito di individuare il parametro Tail Extent Moment (TEM) ed i relativi valori soglia utili a classificare correttamente i tessuti muscolari analizzati. Questo permette di limitare gli aspetti negativi del DNA Comet Assay, metodo sensibile ma non specifico. L'applicazione della metodica messa a punto nel presente lavoro, associata all'uso di campioni pilota positivi e negativi, consente di ridurre al minimo eventuali falsi positivi, quindi di ridurre i costi relativi alle successive analisi di conferma.

### **Bibliografia**

- 1) CEN: "European Standards adopted as CODEX Methods":  
<http://www.cen.eu/cen/Sectors/Sectors/Food/Pages/European%20Standards%20adopted%20as%20CODEX%20Methods.aspx>
- 2) Rondini C., Zampa S., Ramistella L., Pierboni E. (2010) - Identificazione di alimenti irradiati: prime esperienze con il DNA Comet Assay, metodo biologico di screening - SPVet 58, 24-31.
- 3) Böcker W., Bauch T., Müller W.U., Streffer C. (1997) - Technical Report. Image analysis of comet assay measurements - Int. J. Radiat. Biol. 72, 449-460.
- 4) Erel Y., et al. (2009) - Detection of irradiated quail meat by using DNA comet assay and evaluation of comets by image analysis - Radiat. Phys. Chem. 78, 776-781.
- 5) Kumaravel T.S., Awadhesh N. Jha. (2006) - Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals - Mut Res. 605, 7-16.

## Ringraziamenti

Si ringraziano il Dr. Eugenio Chiaravalle ed il Dr. Michele Mangiacotti (CRNR, IZS della Puglia e della Basilicata) per le matrici irradiate e non irradiate utilizzate nel presente lavoro.

## Nota

I dati del presente lavoro sono stati presentati, in forma sintetica, al XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. (Genova, 27-29 ottobre 2010), nel poster: Zampa S., Haouet M.N., Curcio L., Pierboni E., Rondini C. (2010) - Il DNA Comet Assay nello screening di alimenti irradiati: definizione dei parametri utilizzabili per la validazione del metodo - Atti, 400-401.



Studio di validazione del DNA comet assay, metodo di screening per l'identificazione di alimenti irradiati - Validation study of the "DNA comet assay", a screening method for the irradiated foods identification by Zampa S., et al. is licensed under a Creative Commons Attribuzione 2.5 Italia License. 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="mailto:redazione-spvet@izsum.it">redazione-spvet@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>