



Il DNA Comet Assay nell'identificazione di alimenti irradiati: primo approccio con i vegetali - The DNA Comet Assay in the identification of irradiated foods: first experiences with Vegetables

Curcio L., Madeo L., Pierboni E., Rondini C.

Abstract The monitoring of proper labeling of foods treated with ionizing radiation is part of the National Plan of Integrated Controls on Food Security and this is one of the institutional roles of the IIZZSS net (Istituti Zooprofilattici Sperimentali). The single cell gel electrophoresis, Comet assay, is the method of choice for a rapid, sensitive, unexpensive measuring of the DNA breakage in individual cells due to irradiation. The DNA Comet Assay screening to evaluate the DNA damage of animal tissues (muscles of chicken, beef and pork) have been validated and accredited at the IZS of Umbria and Marche (Zampa et al., 2010). In this paper we describe and comment the encouraging results arising from the preliminary studies which have been performed for the correct application of the protocol to plant tissues. In particular, we examined chili and sunflower seeds.

Riassunto Il controllo della corretta etichettatura di alimenti trattati con radiazioni ionizzanti fa parte dei Piani Nazionali Integrati dei Controlli sulla Sicurezza Alimentare e rientra nei compiti istituzionali degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS). Presso l'IZS dell' Umbria e delle Marche, in cui già è attiva ed accreditata una metodica di screening (DNA Comet Assay) applicata su tessuti animali (muscoli di pollo, bovino e suino) [1] sono stati effettuati studi per l'applicazione dello stesso metodo alla rilevazione di tessuti irradiati di origine vegetale; in particolare sono stati presi in esame semi di peperoncino e di girasole. In questo lavoro vengono descritti e commentati tali studi preliminari, che hanno dato un buon esito e sono risultati incoraggianti.

Introduzione

Negli ultimi anni, nel settore alimentare, le tecnologie di irraggiamento non vengono considerate soltanto metodi per prolungare la conservazione dell'alimento, ma anche e soprattutto un'efficace risoluzione per le crescenti esigenze di tipo igienico-sanitario; per abbattere gli elevati costi sanitari derivati dalle malattie trasmesse da alimenti, infatti, in 40 Paesi a livello mondiale tali processi si applicano con successo su circa 45 diverse tipologie di prodotti destinati al largo consumo. Le aziende alimentari utilizzano quindi questi trattamenti con radiazioni ionizzanti, cosiddetti "a freddo", ottenendo un duplice beneficio: da una parte il profilo nutrizionale ed organolettico dell'alimento restano inalterati, in quanto la temperatura non viene elevata significativamente; dall'altra la shelf life del prodotto si prolunga notevolmente senza dover ricorrere all'uso degli additivi chimici. I Paesi che maggiormente utilizzano le radiazioni ionizzanti sui prodotti vegetali sono: Stati Uniti, Cina, Brasile e Sud Africa, che irradiano spezie ed erbe aromatiche essiccate; segue l'Ucraina, dove vengono disinfestati i cereali e la frutta; infine in Giappone ed in Cina il trattamento viene applicato per inibire la germogliazione di patate, cipolle ed aglio (Farkas et al., 2011). In base al Decreto Ministeriale del 30 agosto 1973, in Italia, sono autorizzati alla commercializzazione aglio, patate e cipolle, irradiati al fine di bloccare la germinazione; dal 1996 sono state aggiunte spezie, erbe e condimenti vegetali; la Legge 94 del 2001 inoltre, accogliendo le Direttive dell'Unione Europea 1999/2/CE e 1999/3/CE, ha esteso il permesso di irraggiamento anche a cibi il cui trattamento è consentito in altri paesi dell'UE. In tutti i casi, l'avvenuto trattamento deve essere correttamente dichiarato in etichetta e può essere apposto sulla confezione un apposito simbolo (CODEX-STAN, 2005). Nel 2007 i controlli effettuati in 21 Stati membri dell'Unione Europea sugli alimenti sono stati 6463. La percentuale dei campioni trovati irradiati e non correttamente etichettati, aggiornata al 2007, è passata dall'iniziale 1.5% registrato nel 2001 all'attuale valore di circa 3.14%. Un tale aumento, come è stato messo in rilievo anche dalla Commissione delle Comunità Europee, potrebbe essere legato sia ai campionamenti più mirati sui

prodotti in fase di commercializzazione ed al maggiore impegno dei Paesi in tema di controlli ufficiali, sia alla maggiore esperienza sui metodi di identificazione. Nel 2010 e nel 2011, in Italia, il Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico Veterinario (CRNR), ha dato al Ministero della Salute la propria disponibilità ad effettuare gratuitamente il controllo, in fase di commercializzazione e/o all'importazione, degli alimenti e loro ingredienti eventualmente trattati con radiazioni ionizzanti e/o non correttamente etichettati al fine di fornire i dati richiesti dalla Commissione Europea. Dal 2007 a maggio del 2011, per i controlli ufficiali, sono stati analizzati dal CRNR 374 campioni.

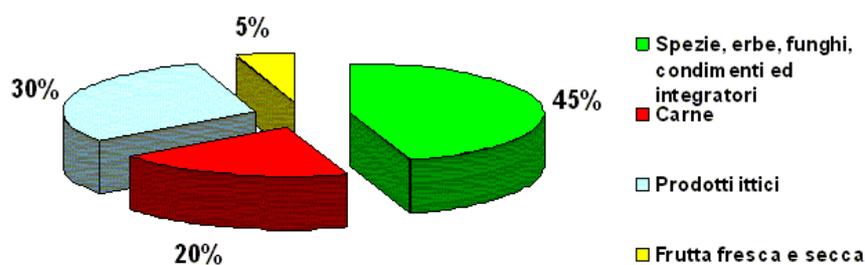


Figura 1. Tipologia di matrici utilizzate

In base a tali controlli sono risultate irraggiate e non correttamente etichettate le seguenti matrici: erbe e spezie, minestre e piatti pronti liofilizzati ed altri vegetali, prodotti ittici, cosce di rana ed altri prodotti provenienti dall'Asia quali noodles freschi ed essiccati; inoltre sono emersi anche prodotti irradiati illegalmente, quali integratori a base di erbe. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM), Unità Operativa (U.O.) partner nel Progetto Ordinario di Ricerca Finalizzata 2007 "Development, validation and application of biological, chemical and physical methods for irradiated food identification and evaluation of the original dose", finanziato dal Ministero della Salute e di cui è capofila l'IZS della Sicilia, oltre che aver messo a punto una metodica di screening (DNA Comet Assay), validata e standardizzata secondo la Norma UNI EN ISO 13874:2003 su matrici di origine animale, ha effettuato le prime prove anche su tessuti di origine vegetale; in particolare sono stati effettuati studi su semi di peperoncino e di girasole, che hanno dato un buon esito. Supportate anche dal Decreto MINSAL del 27/02/2008 (G.U. 197 del 23/08/2008), che ha sancito la "Attribuzione agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali di compiti di controllo ufficiale in materia di analisi chimiche, microbiologiche e radioattive su alimenti di origine vegetale non trasformati", tali metodiche entreranno quanto prima a far parte del patrimonio analitico dell'IZSUM. Secondo la Norma UNI EN ISO prima citata, per verificare l'avvenuto trattamento ionizzante, solo alcuni alimenti di origine vegetale possono essere processati, in particolare: semi e spezie, cipolla, patata, infine frutta. Dai Rapporti ISTISAN 04/21, per quanto riguarda i semi e la frutta, emerge che la metodica è stata applicata su mandorle, fichi, lenticchie, semi di soia, semi esotici, fragole, pompelmo, semi di sesamo, semi di girasole e pepe rosa. In letteratura sono inoltre presenti diversi lavori (Ramanurthy et al., 2004) sulla bacca del *Capsicum annum*, il peperoncino, che è una tra le spezie più frequentemente commercializzata.

Materiali e metodi

Campioni

- Peperoncino: il punto di partenza per lo sviluppo della procedura è stato il frutto secco del *Capsicum annum*, appartenente alla Famiglia delle Solanaceae, in particolare la bacca della cultivar meglio nota come "Peperoncino di Calabria IGP-PTN" (Protezione Transitoria Nazionale in attesa di riconoscimento dall'UE, Dec. 11.12.2008 GU n.7 10 Gennaio 2009). I campioni utilizzati nel presente lavoro sono stati raccolti e direttamente essiccati al sole in Calabria. Per simulare un trattamento con radiazione sui semi di peperoncino essiccato, è stato

provocato uno shock termico attraverso congelamento e successivo scongelamento analogamente a quanto fatto in precedenza con matrici di origine animale (Rondini et al., 2010).

- Semi di girasole: appartengono alla pianta annuale *Helianthus annuus* della Famiglia delle Asteracee, sono frequentemente impiegati come mangime per uccelli e roditori, mentre in cucina sono utilizzati tostati nelle insalate, oppure sottoforma di olio a seguito di processi di estrazione con solvente. I campioni utilizzati sono stati acquistati in un'azienda agricola umbra.

DNA Comet Assay

Il metodo seguito è sostanzialmente conforme a quello descritto nella Norma UNI EN ISO 13874:2003. In sintesi, dopo un pretrattamento idratante sono state preparate le sospensioni monocellulari del tessuto vegetale in esame in una soluzione di agarosio allo 0,8% a basso punto di fusione (Low Gelling Point), le cellule ottenute sono state distribuite su vetrini prerivestiti (Precoating) con uno strato di agarosio 0,5%. Successivamente, le cellule sono state lisate per consentire la fuoriuscita del DNA dal nucleo e sottoposte a corsa elettroforetica. Infine, i preparati sono stati 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). Questo software offre la possibilità di valutare 34 parametri differenti, che sono raggruppati in due distinte categorie: la prima comprende quei parametri che derivano dalla valutazione "globale" del profilo della cometa; la seconda, le misurazioni matematiche pure, geometriche e densitometriche, calcolate per tutte le componenti del profilo esaminato, fornendo i dati necessari alla valutazione dettagliata della cometa. I parametri presi in considerazione, in quanto più significativi, sono stati quattro: TEM (Tail Extent Moment), OTM (Olive Tail Moment), TL (Tail Length) ed il rapporto L/H (Length Tail/Head).

Risultati e discussione

Semi di peperoncino

Nell'immagine seguente (Figura 2) si può notare una morfologia dei nuclei cellulari riconducibile, anche solo da un'analisi visiva, ad un campione non irradiato.

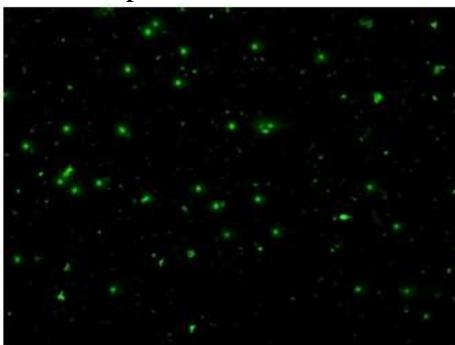


Figura 2. Nuclei cellulari dei semi di peperoncino essiccato

Per eliminare le aspecificità ascrivibili in parte alle strutture celluloso-pectiche proprie della parete cellulare dei vegetali, si è proceduto come descritto nella norma UNI EN ISO 13874:2003 con il prolungamento dei tempi di sedimentazione, riscontrando, tuttavia, una diminuzione del numero dei nuclei cellulari. Per ovviare a tale perdita, si è sfruttata la capacità del software Komet 6.0 utilizzato

per le elaborazioni delle immagini, di discriminare accuratamente tali interferenze, attribuendo ad esse una colorazione differente. Sono state elaborate le immagini per un totale di 100 nuclei/campione di 3 aliquote di semi stoccati a temperatura ambiente come "campioni negativi", considerando i 4 parametri TEM, OTM, TL ed L/H. Al fine di simulare un "campione positivo" i semi del materiale di partenza essiccato erano stati congelati in 3 aliquote distinte e successivamente scongelati (Figura 3), in modo da ottenere una migrazione dei frammenti di DNA dal nucleo e visualizzare le caratteristiche comete.

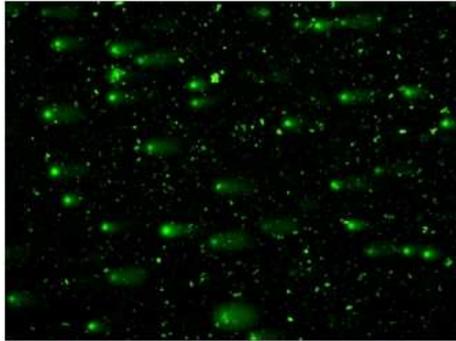


Figura 3. Comete di semi di peperoncino essiccato scongelati.

I valori dei 4 parametri presi in considerazione, tra i 34 ottenibili dall'elaborazione delle immagini e valutati dal software, sono stati confrontati con quelli del "campione negativo" (Tabella 1).

Tabella 1 - Peperoncino. Valori dei parametri presi in considerazione		
Parametri	semi di peperoncino essiccato NEGATIVO*	semi di peperoncino essiccato POSITIVO* (simulato)
TEM	24,66	66,08
OTM	17,07	34,33
TL	92,75	149,76
L/H	1,74	2,78
* = media 3 campioni		

Semi tostati di girasole

Su questa matrice la procedura tecnica applicata ha portato ad ottenere fin da subito ottimi risultati. L'unica eccezione riguarda il background disturbato dalla componente lipidica, trattandosi di semi per definizione "oleosi" (figura 4).

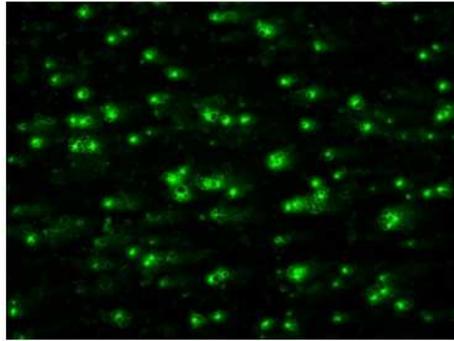


Figura 4. Nuclei cellulari dei semi di girasole tostato

Anche in questo caso, l'elaborazione con il software Komet 6.0 non viene compromessa dalle aspecificità riscontrate, che sono strettamente connesse alla natura oleosa del seme. Come per i semi di peperoncino essiccato sono state elaborate le immagini per un totale di 100 nuclei/campione di 3 aliquote di semi conservati a temperatura ambiente come "campioni negativi". Al fine di ottenere una migrazione dei frammenti di DNA dal nucleo sono state congelate e successivamente scongelate 3 aliquote di semi del campione di partenza (immagine 5), in modo da valutare un gruppo di positivi.

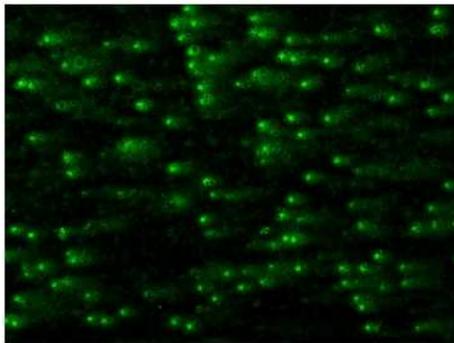


Figura 5. Nuclei cellulari dei semi di girasole tostato

I valori dei parametri presi in esame, ottenuti dall'elaborazione delle immagini, sono stati confrontati con quelli del "campione negativo" (Tabella 2)

Tabella 2 - Girasole. Valori dei parametri presi in considerazione		
Parametri	semi di girasole tostati NEGATIVO*	semi di girasole tostati POSITIVO*(simulato)
TEM	38,27	90,18
OTM	22,26	45,06
TL	118,35	193,19
L/H	2,13	3,25
* = media 3 campioni		

La difficoltà riscontrata nell'approccio con la matrice vegetale è connessa alle diversità istocitologiche caratterizzanti rispettivamente il tessuto animale e quello vegetale. Dal punto di vista istologico l'episperma del seme è costituito da due tegumenti: il tegmen (interno) e il testa (esterno) i quali avvolgono e proteggono l'embrione dagli agenti atmosferici per evitarne il disseccamento o

l'imbibimento di acqua. Tali tegumenti interferivano con l'estrazione dei nuclei cellulari, per cui è stato necessario effettuare un pretrattamento idratante dei semi allo scopo di separare tali tessuti per poter procedere alla separazione meccanica delle cellule (Horak et al., 2009).

Conclusioni

I Piani integrati dei controlli sulla Sicurezza Alimentare della Regione Umbria, prevedono, per gli alimenti vegetali, il prelievo di 4 campioni per tipologia. Le classi di prodotti sottoposte a verifica sono le seguenti: a) spezie, erbe aromatiche, condimenti vegetali (inclusi gli estratti per integratori alimentari); b) funghi secchi, preparati cinesi, aglio, patate, cipolle, grano; c) frutta fresca e a guscio come pistacchi, noci, nocciole, mandorle, noci brasiliane, arachidi, fragole e frutta tropicale (D. D. Regione Umbria, 2010).

Il rapporto percentuale dei controlli previsti sui vegetali rispetto al totale, inoltre, supera il 60%; ciò significa che gli alimenti di origine vegetale trattati con radiazioni ionizzanti sono strettamente monitorati ai fini della tutela del consumatore. Per cui avendo ottenuto dei dati incoraggianti in questo primo approccio con il mondo vegetale sarà fondamentale avere a disposizione materiali di riferimento non irradiati e irradiati per la messa a punto del metodo.

Bibliografia

CODEX-STAN - 1 (2005) labelling of prepacked food - p. 6

http://www.codexalimentarius.net/download/standards/32/CXS_001e.pdf

Determinazione Dirigenziale, Regione Umbria n.691 del 2/02/2010 (S.O. n.3 BUR n.10 del 3/03/2010).

Farkas J., Mohacsi-Farkas C. (2011) - History and future of food irradiation - Trends in Food Science Technology 22, 121-126.

Horak C.I., Di Giorgio M., Kairiyama E. (2009). Identification of irradiated apples for phytosanitary purposes - Radiation Physics and Chemistry 78, 707-709.

Ramamurthy M.S., Kamat A., Kakatkar A., Ghadge N., Bhushan B., Alur M. (2004) - Improvement of shelf-life and microbiological quality of minimally processed refrigerated capsicum by gamma irradiation - International Journal of Food Science and Nutrition 55, 291-399.

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.

Zampa S., Curcio L., Pierboni E., Haouet M. N., Rondini C (2010) - Studio di validazione del DNA comet assay, metodo di screening per l'identificazione di alimenti irradiati - SPVet 63, 42-49.



Il DNA Comet Assay nell'identificazione di alimenti irradiati: primo approccio con i Vegetali by Curcio L. et al., 2011 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>.

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