



INSERTO

lab

- **Tracciabilità genetica, dalla "vecchia" PCR alle tecnologie NGS** 58
- **labNews** 63



58 Tracciabilità genetica, dalla “vecchia” PCR alle tecnologie NGS

Il controllo della qualità e della sicurezza alimentare e la determinazione dell'autenticità di un prodotto stanno trovando, ormai da tempo, un valido strumento nella tracciabilità genetica. Per avere un quadro più completo sull'argomento, “lab” ha intervistato Matteo Busconi, Professore associato presso la Facoltà di Scienze agrarie, alimentari e ambientali, del Dipartimento di Scienze delle Produzioni vegetali sostenibili, dell'Università Cattolica del Sacro Cuore.

a cura di **Giovanni Abramo**

Biologo



© www.shutterstock.com

lab: Cosa si intende per tracciabilità alimentare e perché la necessità di tracciare un alimento?

Matteo Busconi: Secondo la legislazione dell'Ue (Reg. CE 178/2002), per "tracciabilità" si intende la possibilità di rintracciare qualsiasi alimento, mangime, animale per la produzione alimentare o sostanza destinata ad essere utilizzata per il consumo, come alimento o mangime, attraverso tutte le fasi della produzione, trasformazione e distribuzione. Nonostante l'unico termine avente valenza legale è "rintracciabilità", in Italia, sia a livello divulgativo sia nella letteratura scientifica, si è diffuso il termine "tracciabilità". In base ad alcune definizioni, la tracciabilità sarebbe una

raccolta di informazioni da "monte a valle" mentre la rintracciabilità sarebbe da "valle a monte". In realtà, una suddivisione di questo tipo è scarsamente supportabile, in quanto tracciare/rintracciare è una raccolta di informazioni utili per muoversi nella filiera, ma non in una sola direzione.

L'industria alimentare odierna è una realtà globale che coinvolge attori sparsi in tutto il mondo. In questo contesto, anche in conseguenza di crisi alimentari passate che hanno generato grande timore presso il pubblico (BSE, contaminazioni di alimenti con diossina, presenza di batteri patogeni), i consumatori chiedono sempre più trasparenza e informazioni sulla reale composizione e sicurezza degli alimenti. Tuttavia, garantire la tracciabilità lungo l'intera catena, dalla produzione primaria al prodotto finale, è una sfida particolarmente impegnativa; infatti, il numero di intermediari e di sedi geografiche coinvolte nei processi di produzione crea una rete che richiede i più avanzati sistemi di tracciabilità, ma anche dal punto di vista analitico la tracciabilità degli alimenti rimane un argomento impegnativo.

Nell'ambito della tracciabilità degli alimenti, escluso l'annoso problema legato alla presenza di materiale derivante da OGM, i temi più caldi sono:

- l'autenticità alimentare per garantire la corretta composizione di un prodotto in base alla descrizione di quel prodotto e a ciò che ci si aspetta che vi sia incluso, sia in termini di specie (la curcuma può essere utilizzata per adulterare partite di zafferano) sia, nell'ambito della specie, in termini di varietà (in molti casi, in ambito vegetale e animale, il prezzo di mercato di un prodotto fresco o trasformato è largamente dipendente dalla varietà/razza utilizzata);
- la sicurezza alimentare per prevenire la possibile diffusione di intossicazioni causate, tra l'altro, dalla possibile presenza di microorganismi patogeni (batteri, virus o parassiti, che possono contaminare le matrici alimentari).

lab: Tra tutti gli strumenti a disposizione per tracciare il percorso di un alimento, la sua storia e le eventuali adulterazioni, parliamo di analisi del DNA. Ritieni che si tratti di un metodo affidabile e in ogni caso riproducibile? Ad esempio, nel caso dell'olio...

MB: Riguardo questa domanda non esiste una risposta univoca, in quanto la riproducibilità e affidabilità delle analisi del DNA nel settore sono fortemente influenzate dalla matrice alimentare di partenza e dal risultato finale che si vuole ottenere.

In linea di principio, il DNA può essere ritrovato in qualsiasi matrice alimentare. Per questo motivo, la sua analisi è considerata una preziosa fonte di informazione e molte tecniche sono oggi disponibili per analizzare il DNA basate sull'utilizzo di marcatori molecolari.

I metodi basati sul DNA sono però limitati dalla necessità di ottenere frammenti di DNA con l'integrità necessaria per eseguire le analisi. In alcuni prodotti, in particolare quelli altamente processati, il DNA degli ingredienti può essere estremamente frammentato, presente in concentrazioni molto basse o addirittura assente. Quando il DNA è altamente frammentato, è essenziale garantire che il metodo basato sul DNA utilizzato permetta l'individuazione di frammenti di DNA piccoli come 100 coppie di base, o anche inferiori. Inoltre, in molte matrici, soprattutto di origine vegetale, assieme al DNA possono essere co-estratte molecole inibitorie (polifenoli, alcaloidi, tannini, polisaccaridi), per cui l'amplificazione del DNA può fallire o essere poco riproducibile. Da qui si può capire come, una delle fasi più critiche dell'intero processo sia rappresentata dall'estrazione del DNA.

Una volta che il DNA è stato estratto, le analisi effettuabili dipendono da quello che si vuole ottenere,

tra cui: l'identificazione della specie o, nell'ambito della specie, l'identificazione della varietà/razza.

Per identificare la specie, l'uso più noto delle analisi del DNA per l'autenticità degli alimenti è la strategia basata sul DNA barcoding, già in uso presso molti enti normativi del settore negli Stati Uniti e in Europa. Questa strategia si basa sull'utilizzo di marcatori del DNA nucleare od organellare (cloroplasti o mitocondri), a livello dei quali sono presenti differenze nella sequenza degli acidi nucleici utili per identificare la specie: il metodo è stato utilizzato, ad esempio, per i prodotti a base di pesce, consentendo l'identificazione delle specie ittiche. L'identificazione di una specie può avvenire anche mediante l'utilizzo di marcatori specifici per quella determinata specie. Per identificare le varietà, sono utili invece altri marcatori molecolari, come i microsatelliti (*Simple Sequence Repeat*, SSR) o i polimorfismi di singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), che permettono di ottenere il profilo genetico tipico della varietà.

L'olio di oliva extravergine è una delle matrici alimentari più adulterate al mondo, sia mediante l'aggiunta di oli prodotti da altre specie sia mediante l'aggiunta di varietà differenti da quelle attese sulla base dei disciplinari di produzione. L'olio di



oliva è anche una delle matrici più complesse (a causa della sua composizione e del procedimento utilizzato per la sua produzione) da cui partire per isolare il DNA, che è solitamente poco concentrato e altamente degradato. Numerosi articoli scientifici hanno affrontato il tema della tracciabilità delle produzioni di olio giungendo alla conclusione che:

- l'identificazione di specie differenti dall'olivo è facilmente ottenibile;
- l'identificazione varietale è più complessa, soprattutto in relazione al fatto che molti oli non sono monovarietali, ma polivarietali.

È comunque importante sottolineare che il DNA permette di riconoscere la specie o la varietà. Differente è il discorso relativo all'origine geografica; così, ad esempio, una certa varietà sarà sempre riconosciuta come tale, indipendentemente dal fatto che sia coltivata in Italia o in Spagna, con lo stesso nome o con nomi differenti.

lab: Tutto si basa su una banca dati di marcatori molecolari. Questa banca dati è qualcosa di condiviso o rimane all'interno del laboratorio che la mette a punto?

MB: La disponibilità di database liberamente accessibili è di fondamentale importanza nelle analisi molecolari. Infatti, una sequenza di DNA o un profilo genetico, se non vengono confrontati con le informazioni già disponibili, e spesso depositate in database di libero accesso, non permettono di sfruttare appieno tutto il potenziale del DNA in termini di riconoscimento.

Esistono database molto grandi, in cui sono depositate moltissime sequenze di DNA e che sono estremamente utili per l'identificazione delle specie. In questo caso, la sequenza di DNA, ottenuta mediante DNA barcoding, può essere analizzata confrontandola con quanto disponibile presso i database permettendo così, nella maggior parte dei casi, l'identificazione della specie.

Esistono poi database specifici per particolari specie (come nel caso della vite o dell'olivo), in cui sono depositati i profili genetici, spesso ottenuti con set predefiniti e validati di marcatori molecolari SSR (ancora oggi considerati tra i marcatori d'elezione ai fini della tracciabilità varietale), delle singole varietà, come nel caso della vite o dell'olivo. Sebbene la tracciabilità genetica mediante microsatelliti sia una tecnica potente e comprovata, l'identificazione di una varietà sconosciuta non è possibile senza un database di riferimento. Solo in questo caso, infatti, il profilo genetico ottenuto può essere confrontato

con quelli già disponibili, permettendo l'identificazione della varietà.

È inoltre fondamentale che questi database siano continuamente arricchiti mediante l'inserimento di nuovi profili genetici di differenti varietà o nuove informazioni di sequenza relative alle differenti specie.

lab: A che punto sono le metodiche e l'affidabilità delle stesse?

MB: Al giorno d'oggi esistono numerose metodologie utilizzabili per analizzare i DNA, sia in termini qualitativi (riconoscimento di specie e varietà) sia in termini quantitativi (definire la quantità di un certo DNA e, di conseguenza, di un certo ingrediente). Le metodiche sono ormai ben standardizzate e altamente affidabili. Molti Dipartimenti universitari sono attrezzati per offrire conto terzi queste analisi, sfruttando anche la preparazione e competenza del personale operativo. Inoltre, esistono anche numerosi laboratori privati che possono offrire questa tipologia di servizio.

In aggiunta, nuove metodologie vengono continuamente messe a punto e integrate nel settore della tracciabilità per migliorare e ottimizzare le analisi del DNA, come ad esempio la digital PCR o l'applicazione delle metodologie NGS (*Next Generation Sequencing*).

La digital PCR rappresenta la nuova frontiera nella quantificazione degli acidi nucleici, in aggiunta alla più nota real time PCR, o PCR quantitativa. Rispetto a quest'ultima, la digital PCR permette di ottenere più facilmente e in modo più preciso la quantificazione del DNA in un campione, senza dover ottenere un'estrapolazione del dato da una curva di taratura, come nel caso della PCR quantitativa. Uno dei più recenti metodi basati sul DNA, che sono stati introdotti per l'analisi degli alimenti, è il sequenziamento NGS. Il metodo NGS si basa sull'analisi del DNA attraverso il suo sequenziamento ed è in grado di produrre milioni di sequenze di DNA individuali, tutte raggruppate in un unico file. Con l'NGS è possibile produrre sequenze diverse dai vari DNA che compongono il prodotto alimentare. Ciò significa che il metodo è appropriato per l'uso in prodotti contenenti molti ingredienti, visivamente non identificabili e miscelati. Fondamentalmente, poiché ogni diverso ingrediente contiene una sequenza di DNA unica (la propria impronta digitale), con l'NGS si sequenzierà virtualmente ciascuna delle molecole di DNA presenti in un campione per produrre singole sequenze di DNA per ciascuna.

Pertanto, a differenza del metodo di sequenziamento classico, l'NGS sta diventando il metodo di scelta per l'identificazione dei DNA di prodotti contenenti più ingredienti.

lab: Infine, cosa vede all'orizzonte?

MB: Per il futuro è sempre più probabile una diffusione maggiore delle tecniche NGS al campo della tracciabilità alimentare. Questo metodo sta cambiando radicalmente l'approccio analitico, passando dal rilevamento di una o più specie alla determinazione di tutte le specie in un campione e ponendosi di fatto come il metodo di elezione per la corretta identificazione delle specie in alimenti complessi.

Utilizzando software appropriati, il campo di applicazione dell'NGS è di fatto senza limitazioni e può essere utilizzato per qualsiasi tipo di matrice alimentare, sia che contenga o meno sequenze di DNA differenti. Ciò significa che è possibile rilevare qualsiasi tipo di specie, in quanto il metodo analitico non è più incentrato sul rilevamento di un numero limitato di specie. Quando un campione viene analizzato la domanda non è più: "Le specie A, B o C sono presenti nel campione?". Utilizzando l'NGS, la nuova domanda è: "Quali specie sono presenti nel campione?".

Poiché tutte le sequenze ottenute possono essere confrontate con una specifica banca dati del DNA, ogni corrispondenza tra le sequenze NGS ottenute e la banca dati dà origine a un risultato di identificazione della specie, producendo un elenco di specie invece di un risultato di presenza/assenza per le specie mirate. Inoltre, utilizzando programmi appropriati, è possibile creare un rapporto di sequenze di DNA ottenute per ogni specie. A causa della natura *untarget* di questo metodo è possibile identificare anche specie esotiche. Questo metodo può essere applicato con successo anche all'identificazione delle specie batteriche presenti in un campione, facilitando così l'individuazione della presenza di eventuali patogeni.

Dato il ruolo dell'NGS nella tracciabilità, il primo *workflow* relativo all'utilizzo di questa metodica per l'identificazione delle specie in alimenti è stato annunciato per il mercato nel novembre 2018. Inoltre, il metodo NGS è stato di recente avviato alla standardizzazione, in particolare a livello ISO, per iniziare a definire i requisiti minimi relativi a tutte le analisi pre- e post-bioinformatiche richieste durante le analisi NGS, includendo, tra l'altro: la definizione delle regioni di DNA da analizzare, le banche dati di DNA da utilizzare per l'identificazione delle specie.



Insieme alle questioni di autenticità, le Autorità di regolamentazione locali rispondono sempre di più alla crescente preoccupazione per tutto ciò che può avere un impatto sulla salute umana. Questo aggiunge ulteriori livelli di regolamentazione ai mercati alimentari.

Inoltre, i consumatori di oggi sono molto più preoccupati per gli ingredienti di un prodotto. Spesso c'è la preoccupazione di stare pagando per qualcosa di diverso da quanto etichettato e per cui hanno pagato. Ulteriori preoccupazioni dei consumatori riguardano, tra l'altro, gli allergeni, le intolleranze alimentari, la protezione delle specie e la sostenibilità delle specie (tutte situazioni per cui una corretta identificazione della specie o delle varietà può essere fondamentale). Infine, il contenuto nutrizionale di un prodotto dipende fortemente dagli ingredienti utilizzati per la sua produzione e la sostituzione totale o parziale di qualsiasi ingrediente specifico può avere un impatto su di esso. Ognuna di queste preoccupazioni può essere altamente dannosa per un marchio alimentare, poiché i consumatori possono perdere rapidamente la fiducia.

Uno dei maggiori vantaggi del metodo NGS è la sua natura non mirata che consente la piena conoscenza del contenuto di DNA di un campione di cibo. Inoltre, è possibile identificare praticamente qualsiasi tipo di sequenza di DNA utilizzando gli strumenti bioinformatici appropriati disponibili. L'uso di NGS può avere un impatto enorme su tutte le questioni relative all'integrità degli alimenti, tra cui l'autenticità, la sicurezza e la tracciabilità.

► Fragole, PROFILAZIONE CHIMICA per studiare l'EFFETTO delle condizioni di COLTIVAZIONE e delle CULTIVAR

La composizione degli alimenti, in termini di nutrienti, composti bioattivi e altri componenti, è strettamente regolata da molteplici fattori, come il



genotipo, l'origine geografica, i fattori ambientali e le condizioni agronomiche. Tali fattori possono quindi rappresentare potenziali elementi di tracciabilità e autenticazione.

In un recente studio¹, un team di ricercatori spagnoli ha eseguito una profilazione multi-target per caratterizzare la composizione chimica delle bacche di fragola di cinque cultivar (Aromas, Camarosa, Diamante, Medina e Ventana), coltivate in due sistemi idroponici (cicli chiuso e aperto), durante due campagne consecutive, caratterizzate da diverse condizioni climatiche. I ricercatori hanno analizzato molteplici componenti, strettamente correlate alle caratteristiche sensoriali e alle proprietà nutrizionali di tali "frutti", tra cui zuccheri, acidi organici, composti fenolici ed elementi minerali essenziali e non essenziali. Sono stati poi utilizzati diversi approcci statistici per selezionare le caratteristiche chimiche identificative delle

diverse cultivar e delle differenti condizioni agronomiche. Antociani, acidi fenolici, saccarosio e acido malico sono risultati essere le variabili più discriminanti tra le cultivar, mentre le condizioni climatiche e il sistema di coltivazione si sono rivelate alla base dei cambiamenti nel contenuto di polifenoli. Questi risultati dimostrano quindi l'utilità di combinare approcci di profilazione chimica multi-target con strumenti chemiometrici avanzati per la ricerca sulla tracciabilità alimentare.

1. González-Domínguez R., Sayago A., Akhatou I., Fernández-Recamales Á. Multi-chemical profiling of strawberry as a traceability tool to investigate the effect of cultivar and cultivation conditions. *Foods*, 2020;9(1). doi: 10.3390/foods9010096.

► MACROALGHE per il consumo umano, FIRME LIPIDOMICHE per individuarne l'ORIGINE

L'aumentata pressione demografica e le risorse altrimenti limitate hanno motivato il mondo a guardare al mare per la ricerca di risposte e soluzioni sostenibili. Tant'è che la coltura di macroalghe destinate al consumo umano sta vivendo uno sviluppo senza precedenti anche in Europa, dove l'alga bruna *Saccharina latissima* è la principale rappresentante. Ovviamente, a seconda delle regioni di coltivazione, le condizioni ambientali marine ne influenzano



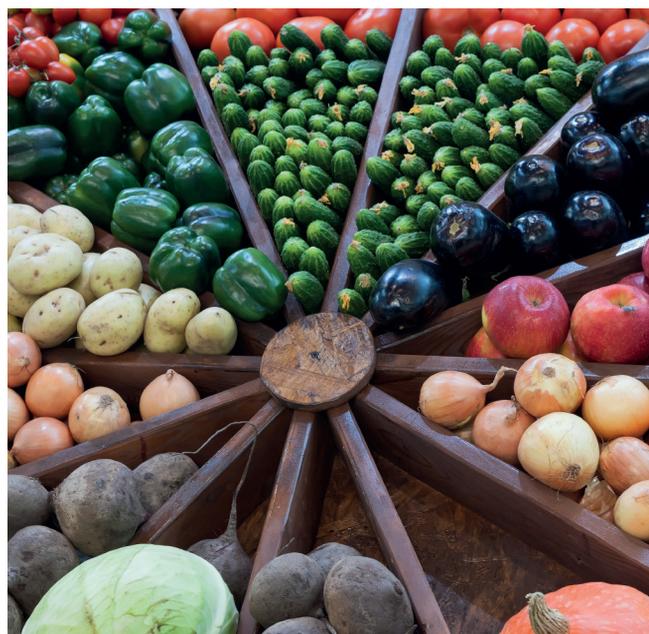
la composizione biochimica. Uno studio¹ ha confrontato le composizioni elementari, i profili degli acidi grassi e i lipidomi di *S. latissima* proveniente da tre località europee (Francia, Norvegia, Regno Unito), trovando differenze significative. Più in particolare, i campioni norvegesi hanno evidenziato un contenuto lipidico pari al doppio di tutti gli altri e un contenuto proteico decisamente inferiore (2,6% vs 6,3% della Francia e 9,1% del Regno Unito). Anche i profili di acidi grassi sono risultati molto differenti, con i campioni del Regno Unito che hanno mostrato un contenuto inferiore di omega-3 (21,6%). Per quanto riguarda il profilo lipidomico, i campioni dalla Francia sono risultati arricchiti in lisolipidi, mentre quelli dalla Norvegia hanno mostrato una firma particolare data da fosfatidilglicerolo, fosfatidilinositolo e fosfatidilcolina. I campioni Regno Unito presentavano livelli più elevati di fosfatidiletanolamina e, in generale, un contenuto inferiore di galattolipidi. Queste differenze evidenziano l'influenza delle condizioni ambientali specifiche del sito nella "creazione" dei fenotipi biochimici delle macroalghe e del loro valore nutrizionale. E le differenze registrate nei lipidomi di *S. latissima* consentono di individuare specifiche specie lipidiche che potrebbero rappresentare biomarcatori di origine. Questa scoperta è rilevante per le future applicazioni nel campo della tracciabilità dell'origine geografica e nel controllo degli alimenti.

Foto: © Cwmhiraeth, Wikipedia

1. Monteiro J.P., Rey F., Melo T., Moreira A.S.P., Arbona J.F., Skjermo J., Forbord S., Funderud J., Raposo D., Kerrison P.D. et al. The unique lipidomic signatures of *Saccharina latissima* can be used to pinpoint their geographic origin. *Biomolecules*, 2020;10(1). doi: 10.3390/biom10010107.

► MALDI-MS imaging per la TRACCIABILITÀ e la SICUREZZA degli alimenti

Gli ingredienti alimentari contengono un'ampia varietà di componenti nutrizionali, come carboidrati, proteine, peptidi, lipidi, minerali, vitamine, aminoacidi e acidi organici. E oltre a queste sostanze possono contenere anche contaminanti più o meno dannosi per la salute.



Tuttavia, le grandi quantità di metaboliti a basso peso molecolare presenti negli alimenti, come aminoacidi, acidi organici, vitamine, lipidi e tossine, rendono difficile analizzare la distribuzione spaziale di queste molecole. La *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry* (MALDI-MS) imaging è una tecnologia di ionizzazione che consente il rilevamento di piccoli metaboliti in sezioni di tessuto senza richiedere purificazione, estrazione, separazione o marcatura e la sua applicazione nell'analisi degli alimenti migliora la visualizzazione di questi composti, identificando così non solo il contenuto nutrizionale ma anche l'origine geografica dell'alimento. Un recente studio¹ descrive tutte le possibili applicazioni della MALDI-MS imaging, dimostrandone i vantaggi e le prospettive rispetto agli approcci convenzionali. E si prevede che, in un prossimo futuro, i continui progressi e miglioramenti di questa tecnologia potranno offrire notevoli benefici a consumatori, ricercatori e produttori di alimenti in termini di tracciabilità, sicurezza alimentare e miglioramento della qualità dei prodotti.

1. Morisasa M., Sato T., Kimura K., Mori T., Goto-Inoue N. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging for food analysis. *Foods*, 2019;8(12). doi: 10.3390/foods8120633.