

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

BIOMEDICINA COMPARATA ED ALIMENTAZIONE

Dip. Sanità pubblica patologia comparata ed igiene veterinaria

Corso di laurea magistrale in  
Biotecnologie Per L'alimentazione

# Applicazione della Real-Time PCR per l'identificazione di specie carnee in alimenti

Relatore

Dott.ssa, *Barbara Cardazzo*

Correlatore

Dott.ssa, *Claudia Zampieron*

Laureando

*Simone Biondaro*

Matricola n. 1037134

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013



# SOMMARIO

## INTRODUZIONE

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.1   | Frodi alimentari nella storia.....   | 1  |
| 1.2   | Definizione delle frodi alimentari.....  | 3  |
| 1.3   | La giurisdizione delle frodi alimentari e commerciali.....   | 5  |
| 1.4   | Cause che inducono alle frodi alimentari.....  | 7  |
| 1.5   | Le frodi alimentari più diffuse.....   | 8  |
| 1.6   | Tracciabilità.....   | 11 |
| 1.7   | Evoluzione della biologia molecolare per l'identificazione di specie...14                            |    |
| 1.7.1 | PCR.....   | 15 |
| 1.7.2 | Sviluppi della PCR quantitativa.....   | 17 |
| 1.7.3 | PCR Real-Time.....   | 18 |
| 1.8   | L'importanza della validazione del metodo.....   | 22 |
| 2     | SCOPO DELLA TESI.....  | 25 |
| 3     | MATERIALI E METODI.....  | 26 |
| 3.1   | Campo di applicazione e campioni di riferimento.....   | 26 |
| 3.2   | Protocollo di estrazione.....  | 27 |
| 3.3   | Dosaggio del DNA estratto.....   | 28 |
| 3.4   | Preparazione della mix di reazione e caricamento.....  | 29 |
| 3.5   | Descrizione del sistema Real-Time PCR: Applied Biosystem<br>7500/7500 Fast Real-Time PCR System..... | 36 |
| 3.6   | Interpretazione dei dati.....  | 39 |
| 3.7   | Calcolo cut-off .....  | 39 |
| 4.    | RISULTATI.....   | 41 |
| 4.1   | Determinazione del cut-off .....   | 41 |
| 4.2   | Analisi del DNA nei campioni commerciali.....  | 44 |

|    |                    |    |
|----|--------------------|----|
| 5. | DISCUSSIONE.....   | 52 |
| 6. | CONCLUSIONI.....   | 56 |
| 7. | BIBLIOGRAFIA ..... | 58 |

## RIASSUNTO

L'espressione frode alimentare si riferisce ad una pluralità di condotte illecite volte alla adulterazione, alterazione, contraffazione, sofisticazione dei prodotti alimentari. La sofisticazione si configura come un'operazione fraudolenta attraverso cui il prodotto alimentare viene sostituito in alcuni suoi ingredienti e trattato in modo da renderlo "più attraente" o simile ad altri prodotti più pregiati e, conseguentemente, più costosi. Il controllo delle specie animali contenute negli alimenti è importante al fine di tutelare i consumatori da eventuali frodi e di tutelare le loro convinzioni etico-religiose.

Il metodo utilizzato nell'identificazione di specie in alimenti è la PCR Real-Time in quanto è caratterizzata da una maggiore sensibilità e specificità.

La sua applicazione all'identificazione e alla quantificazione di specie degli ingredienti presenti negli alimenti permette di verificare la corretta etichettatura in tempi ridotti e con un'alta affidabilità.

In questo studio è stata utilizzato, per le specie più commerciali, lo strumento del cut-off definito all'1% di carne target in carne non target creato e verificato come da raccomandazioni EURL. Inoltre sono stati analizzati 195 campioni di alimenti pervenuti presso l'Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie al fine di verificare la corrispondenza con quanto dichiarato in etichetta. Di questi 174 erano campioni destinati all'alimentazione umana e 21 all'alimentazione per animali da affezione. Nell'ambito dell'alimentazione umana le non conformità si sono rilevate 4 non conformità (in totale il 2%), distribuite in particolare tra i campioni di kebab (7%), un caso di ravioli contenenti carne equina ed un caso di carne cotta analizzata in autocontrollo per verificare la presenza della specie coniglio verificatasi poi gatto. Nei campioni di pet-food le non conformità arrivano addirittura al 76%, nei campioni costituiti da farine animali utilizzate per la produzione di mangimi non si è osservata la presenza della specie indicata.



## **ABSTRACT**

The term food fraud refers to a plurality of illegal conducts, such as adulteration, alteration, falsification and substitution of food. The food sophistication consists in a fraudulent act through which food ingredients are substituted in order to make a food product more attractive or similar to other precious products and therefore more expensive. Controlling of animal species in food is important for the protection of consumers from fraud and their ethical and religious belief.

The method used for identification of food species is the Real Time PCR, a technique characterized by its high sensitivity and specificity. Its application in identification and quantification of species present in the food ingredients allows to verify the correct labeling in less time and with high reliability.

In this study has been used, for most commercial species, the method of cut-off at 1% of target meat in non target meat, created and verified according to EURL recommendations.

Furthermore 195 food samples were analyzed. These samples were received at the experimental Zooprofilattico Institute of Venezia in order to verify its conformity with the label claim. Of these samples, 174 were intended for human consumption and 21 for animals with disease. With regard to samples for human food, 4 non-conformity were observed (total 2%), distributed between samples of kebab (7%), one case of ravioli containing horse meat and a case of cooked meat analyzed in self-control to verify the presence of rabbit species that occurred then cat. In pet food samples non-conformity even come to 76%. In the samples of animal meal used for production of animal feed, the presence of the species indicated was not observed





# 1. FRODI ALIMENTARI IN ITALIA

## 1.1 Le frodi alimentari nella storia

La frode alimentare può essere considerata una delle attività criminose più antiche e saldamente radicate nella vita sociale.

I primi reati contro la salute, attraverso adulterazioni e contraffazioni di alimenti, si sono avuti con i primi scambi commerciali. Ad esempio nell'antico Egitto chi reiteratamente poneva in essere truffe in ambito alimentare veniva condannato a morte. Oltre agli aspetti repressivi, gli egizi risultano essere stati i precursori anche delle attività di prevenzione dal momento che apponevano il marchio sulle carni macellate (Nebbia G., 1962).

Le prime misure in materia di prevenzione dei reati alimentari si sono registrate anche ad Atene e nell'antica Grecia, in cui è stata riscontata la presenza di vigili sanitari, detti “*Agora nomi*”. Ad essi era demandato il compito di controllare il commercio e, addirittura, alcuni di loro erano specializzati nello scoprire le frodi sul vino. Una delle frodi alimentari più frequenti, infatti, consisteva nel trattare i vini giovani, con particolari sostanze, per poterli vendere come vini d'annata. Nel diritto romano si riscontrano molteplici norme di tipo “verticale”, vale a dire specifiche per un dato prodotto alimentare, ed in particolare era prevista la pena dell'ingiuria per chi inquinava gli acquedotti (Nebbia G., 1962).

La fattispecie, oggi è regolata dall'art. 439 c.p. “Avvelenamento di acque o di sostanze alimentari” nella sua originaria formulazione prevede che “*Chiunque avvelena acque o sostanze destinate all'alimentazione, prima che siano attinte o distribuite per il consumo, è punito con la reclusione non inferiore a quindici anni. Se dal fatto deriva la morte di alcuno, si applica l'ergastolo; e, nel caso di morte di più persone, si applica la pena [di morte]*” (Per i delitti previsti nel codice penale e in altre leggi diverse da quelle militari di guerra, la pena di morte è stata soppressa e sostituita con l'ergastolo con il d.lgs.lt. 10 agosto 1944, n. 224 e d.lgs. 22 gennaio 1948, n. 21).

Nell'India del IV secolo prima di Cristo” chi esponendo il frumento per la vendita,

poneva uno strato di frumento di buona qualità per celare il sottostante grano pessimo, veniva condannato ad essere “sfigurato”. Plinio il Vecchio narra di fornai che addizionavano la farina con una specie di talco, una terra bianca che veniva raccolta in una collina fra Napoli e Pozzuoli (Nebbia G., 1962).

Nel '200, a Parigi, era fin troppo facile imbattersi in birra cui erano state aggiunte delle bacche, che grazie al loro odore e sapore, dovevano mascherarne la cattiva qualità; il problema divenne così grave e diffuso, che nel 1292 la corporazione dei birrai della città fu costretta ad intervenire intimando di non perseguire nel comportamento criminoso. Fu sempre nella capitale francese che nel 1396, un'ordinanza dovette vietare di vendere burro vecchio e rancido colorato o mischiato ad erbe aromatiche che ne contrastassero il sapore ormai stantio. Tra le altre frodi alimentari comuni in Europa, ci furono quella dell'olio, spesso allungato con acqua, e del vino, che non si esitò a colorare di rosso con l'aggiunta di ossido di piombo, altamente tossico per l'organismo. I cittadini inglesi del '700 dovevano prestare attenzione al consumo di gin, un liquore, spesso mescolato all'acquaragia, mentre nell'800, il pericolo maggiore era costituito dal pane sbiancato con allume. In Italia nell'Aprile del 1986 fu scoperta la frode del metanolo nel vino, il prodotto adulterato causò l'avvelenamento e l'intossicazione di parecchie decine di persone, per la maggior parte risiedenti in Lombardia, Piemonte e Liguria cui provocò danni personali gravissimi (cecità, danni neurologici) ed in 23 casi la morte; le vittime avevano bevuto vino a cui avevano aggiunto dosi elevatissime di metanolo per alzare la gradazione alcolica, ignorandone la tossicità per l'organismo (Nebbia G., 1962).

L'atavica lotta verso quei fenomeni che, in campo alimentare, possono minare l'incolumità collettiva e la fiducia dei consumatori con gravi ripercussioni di tipo sociale ed economico, ha in questi ultimi decenni, ricevuto l'attenzione di tutti i soggetti coinvolti, pubblici e privati.

Gli interessi protetti, pur eterogenei, tendono nel loro insieme all'affermazione di un sistema che garantisca certezza della qualità e sicurezza degli alimenti. La salvaguardia della salute collettiva è volta ad impedire la produzione e la circolazione di alimenti nocivi ed inoltre a prevenire un potenziale pericolo di ordine sanitario; la protezione del consumatore, dagli inganni tesi nei suoi confronti nell'atto di commercio, è salvaguardata dagli operatori del settore alimentare (OSA).

La dottrina maggioritaria ritiene che il bene giuridico tutelato debba rinvenirsi nella fiducia che i consumatori ripongono nella generalità dei prodotti ed in particolare di quelli alimentari.

## **1.2 Definizione delle frodi alimentari**

Con il termine di “frodi alimentari” ci si riferisce alla produzione ed al commercio di alimenti non conformi alla normativa vigente, nelle quali all’elemento dell’anomalia sanitaria o qualitativo merceologica si unisce il profilo dell’inganno, quale travisamento della realtà indotto dal frodatore nella sfera cognitiva di un altro soggetto.

Le frodi alimentari si distinguono in due tipologie: quelle di natura sanitaria e quelle di natura commerciale, a seconda che abbiano incidenza sulla salute in termini di pericolosità oppure che ledano i diritti contrattuali di un altro operatore o di un acquirente finale (il consumatore).

**Frodi sanitarie** (art. 32 Costituzione-Tutela della salute pubblica): per frodi sanitarie possono essere identificate tutte quelle situazioni di commercializzazione o somministrazione, dove, per fini di lucro, si inganna la buona fede del consumatore, che, oltre al danno economico, può subire un danno alla salute. Si tratta, in sostanza, di fatti e comportamenti che rendono le sostanze alimentari dannose ed attentano alla salute pubblica. Possono essere commesse da “*chiunque detiene per il commercio o pone in commercio o distribuisce per il consumo acque, sostanze o cose da altri avvelenate, adulterate o contraffatte in modo pericoloso per la salute pubblica*”. Ciò significa che il reato di frode si configura per il solo fatto di esporre, porre in commercio o distribuire, anche se, materialmente, non sono state cedute al consumatore.

**Frodi commerciali**: le frodi commerciali ledono i diritti patrimoniali e contrattuali del consumatore. Si verificano quando nel corso di un'attività commerciale, avviene la “*consegna all'acquirente una cosa mobile per un'altra, ovvero una cosa mobile,*

*per origine, provenienza, qualità o quantità, diversa da quella dichiarata o pattuita, è punito, qualora il fatto non costituisca un più grave delitto [440-445, 455-459], con la reclusione fino a due anni o con la multa fino a 2.065 euro”* . In questi casi non si hanno modificazioni delle caratteristiche dell'alimento, tali da renderlo dannoso; non vi è un rischio per la salute del consumatore, ma si configura un illecito profitto a suo danno. Affinché si realizzi una frode in commercio è sufficiente una piccola differenza sull'origine del prodotto o la sua provenienza o la qualità. Il classico esempio si ha quando il salumiere pesa l'affettato senza sottrarre la tara dell'involucro. Il tentativo di frode in commercio si configura anche nell'attività di ristorazione, laddove vengono impiegati prodotti surgelati, senza che ve ne sia menzione nel menù. La frode nell'esercizio del commercio è disciplinata dall'art. 515 del codice penale, ai sensi del quale *“Chiunque, nell'esercizio di una attività commerciale, ovvero in uno spaccio aperto al pubblico,”*.

Le frodi alimentari vengono generalmente suddivise in:

1. Frodi sulla qualità intrinseca del prodotto:

- Sofisticazione (Codice penale art.515/art.5 L. 283/62): azione fraudolenta che consiste nell'aggiungere o sostituire all'alimento sostanze estranee che ne alterano l'essenza, corrompendo o viziando la composizione naturale e simulandone la genuinità con lo scopo di migliorarne l'aspetto o di coprirne i difetti.

In sostanza, il termine “sofisticazione” non è presente nella legislazione penale italiana ed anche le sentenze a cui il termine è associato paiono risalenti ad un periodo antecedente alla norma di depenalizzazione.

- Adulterazione (Codice Penale art. 440,442): comprende tutte le operazioni che alterano la struttura originale di un alimento mediante sostituzione di elementi propri dell'alimento con altri estranei, ovvero con la sottrazione di elementi propri dell'alimento, o ancora con l'aumento della quantità proporzionale di uno o più dei suoi componenti. E' procurata a fini qualitativi per mascherare i difetti (aroma aggiunto per coprire un cattivo odore), migliorare artefattamente i caratteri

organolettici (addizione di colorante) o quantitativi (aumentare peso o volume); al contrario, può produrre un peggioramento (taglio di una sostanza pregiata con una scadente). Qualora si sottraggano suoi elementi essenziali, si avrà il corrompimento implicante una degenerazione della sostanza originale (asportazione del grasso dal latte). Altri esempi sono rappresentati dall'aggiunta di alcool metilico nel vino, dall'aggiunta di acqua o ancora dalla produzione di mozzarella con caseine o latte in polvere zootecnico.

- Alterazione (legge.283/62 art.5): azione fraudolenta che consiste nello spacciare come regolari prodotti che hanno comunque subito delle modificazioni nei componenti o nutrienti, a causa, ad esempio, di una errata conservazione; l'esempio tipico di alterazione è quello di modificare la data di scadenza posta sulla etichetta, oppure di "bonificare" dei prodotti ammuffiti o deteriorati e quindi metterli in vendita come freschi.

## 2. Frodi riguardanti la commercializzazione degli alimenti:

- Contraffazione (Codice Penale art. 440,442): azione fraudolenta che consiste essenzialmente nel conferire al prodotto alimentare una denominazione diversa da quella reale, solitamente di un prodotto più pregiato, ovvero di formare un alimento apparentemente genuino con sostanze diverse da quelle di cui è normalmente composto. Ad esempio, mettere in vendita un olio di semi con la denominazione di olio di oliva, oppure "marchiare" un formaggio comune con il simbolo di un prodotto a denominazione di origine controllata o anche vendere per formaggio di pecora un formaggio fatto con latte bovino.
- Falsificazioni: consiste nello sostituire un prodotto con un altro, come nel classico esempio della margarina al posto del burro.

### 1.3 La giurisdizione delle frodi alimentari e commerciali

I reati quali l'avvelenamento di acque o di sostanze alimentari (art. 439 c.p.), l'adulterazione o contraffazione di sostanze alimentari (art. 440 c.p.), il commercio di

sostanze alimentari contraffatte o adulterate (art. 442 c.p.), il commercio di sostanze alimentari nocive (art. 444 c.p.) sono comprese nel Titolo VI del codice penale “Dei delitti contro l’incolumità pubblica” ed in particolare nel Capo I “Dei delitti di comune pericolo mediante frode”. Altri delitti, quali la frode nell’esercizio del commercio (art. 515 c.p.), la vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine (art. 516 c.p.), la vendita di prodotti industriali con segni mandaci (art. 517 c.p.), la contraffazione di indicazioni geografiche o denominazioni di origine dei prodotti agroalimentari (art. 517 quater) sono disciplinati nel Titolo VIII “Dei delitti contro l’economia pubblica”, Capo II “dei delitti contro l’industria ed il commercio”. La prima osservazione in materia di frode alimentare è rappresentata dal fatto che la distinzione tra frodi sanitarie e frodi commerciali si ripropone con riferimento al concetto di pericolosità: affinché si possa ritenere configurata la frode cosiddetta “sanitaria” occorre che possa essere ravvisato l’elemento della “pericolosità” per la salute (art. 439, 440, 442 e 444 c.p.), mentre per la configurazione di talune frodi, che possono essere compiute anche in ambito alimentare, la pericolosità non ne costituisce elemento (art. 515, 516, 517 e 517 quater c.p.).

Nell’ambito delle “frodi sanitarie” il momento fraudolento costituisce uno degli elementi essenziali del delitto contro la salute pubblica, ma la frode resta – per così dire – assorbita nella più grave e complessa fattispecie penale che mira a tutelare, in primo luogo, la salute pubblica. La frode presuppone il dolo del soggetto agente, mentre nei casi in cui il dolo non è ravvisabile, come nell’art. 452 c.p. “Delitti colposi contro la salute pubblica” non si potrà parlare di frode alimentare, ma di delitti colposi di comune pericolo.

La frode in commercio e gli altri attentati alla fiducia commerciale hanno un carattere generale, nel senso che si tratta di fattispecie che non fanno riferimento ad un determinato bene (es. alimenti), ma si pongono a tutela dell’economia pubblica ed in particolare di quella connessa all’industria ed al commercio.

Ultima importante considerazione è che in base al principio di specialità, la frode in commercio (art. 515 c.p.) non trova applicazione nel caso di consegna di sostanze alimentari contraffatte o adulterate: comportamento punito, appunto, ai sensi dell’art. 440 c.p..

Esempi di frode commerciale nel settore degli alimenti è la detenzione di alimenti

congelati o surgelati all'interno di un esercizio commerciale, senza che sia indicata tale qualità.

Per quanto riguarda la messa in vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine (art. 516 c.p.) è opportuno precisare che per sostanze “non genuine” non si intende necessariamente che l'alimento abbia subito una diminuzione del potere nutritivo, ma è sufficiente un'alterazione nella loro essenza o nella normale composizione tale da non corrispondere alle aspettative degli eventuali acquirenti. Si tratta, infatti, di un reato contro la fiducia commerciale. Ad esempio, rientrano in questa ipotesi delittuosa la vendita di latte scremato, il vino annacquato, salsicce di maiale contenenti carne bovina, caffè mescolato con surrogati, ed altro. Affinché il reato si consumi occorre che il venditore presenti l'alimento come genuino, ossia in modo tale da legittimare nell'acquirente l'opinione che si tratti di cosa genuina e senza che la vendita si sia concretizzata.

#### **1.4 Motivazioni che inducono alle frodi alimentari**

Le cause che consentono ad operatori senza scrupoli di realizzare le frodi in campo alimentare sono numerose:

- i. desiderio di ottenere un rapido profitto, anche se, non sempre, c'è il danno economico per il consumatore;
- ii. globalizzazione del mercato con l'ingresso di merci non sempre convenzionali, soprattutto da paesi lontani, che facilmente si prestano ad adulterazione o contraffazioni o vengono impiegati per sostituire prodotti “nostrani”;
- iii. evoluzione delle conoscenze scientifiche e tecnologiche che hanno consentito la messa a punto di nuove tecniche per rallentare, inibire o mascherare eventuali condizioni indesiderate dell'alimento o conferire allo stesso caratteristiche che in realtà non possiede. A volte si assiste all'estremizzazione dei processi di produzione con l'elaborazione di alimenti più complessi e delicati che richiedono interventi illegali da parte dell'operatore per conferire al prodotto una maggiore gradevolezza

iv. pubblicizzazione e diffusione dei prodotti cosiddetti tradizionali che si stanno ricavando una buona nicchia di mercato con l'aumento dei prezzi e della domanda a cui corrisponde, spesso, l'immissione di prodotti fraudolentemente spacciati per prodotti di pregio, ma che non rispecchiano quanto dichiarato;

v. complessità delle normative in campo alimentare, spesso articolate, di difficile comprensione ed interpretazione che induce l'OSA ad aggirarle, ad agire contro legge, nella speranza che il suo operato passi inosservato, senza, però, curarsi delle possibili ripercussioni negative che tale comportamento potrebbe avere sulla salute del consumatore;

vi. difficoltà nel reperimento di materi prime idonee che spesso vengono sostituite da quelle di minor pregio o di diversa origine.

### **1.5 Le frodi alimentari più diffuse**

Nell'ambito dei prodotti vinicoli la frode principale consiste nell'impiego di zuccheri diversi da quelli provenienti dall'uva e sottoprodotti vinosi, quali vini anomali, ultra torchiati e additivi ad uso enologico non consentiti. Si è verificato in passato (1986) il gravissimo episodio di "frode tossica", in cui venne aggiunto a vini di bassa gradazione o annacquati il famigerato "metanolo", che provocò la morte di 25 persone.

Altre frodi meno pericolose sono: l'utilizzo di uve da tavola, non adatte alla vinificazione, per la produzione di vini, spacciati poi come Indicazione Geografica Tipica (I.G.T.), Denominazione di Origine Controllata (D.O.C.) o Denominazione Origine Controllata e Garantita (D.O.C.G.).

Per quanto riguarda il pesce, le più frequenti frodi hanno interessato:

- la vendita di prodotti scongelati per freschi;
- la vendita di prodotti di allevamento per prodotti di cattura;



- la vendita di specie diverse da quelle dichiarate;
- la vendita di prodotti congelati coperti da glassatura senza l'indicazione del peso netto;
- della percentuale di glassatura;
- la vendita di prodotti trattati con additivi per mascherare un preesistente stato di alterazione.

Altro importante alimento oggetto di frequenti frodi è l'olio di oliva, trattato con l'aggiunta di oli di semi vari scadenti, o, in altri casi, completamente contraffatto, utilizzando oli di semi vari colorati poi con clorofilla (detto anche verdone) oppure con betacarotene per essere venduto come extravergine di frantoio, confezionato in bottiglie con etichette stilizzate che richiamano l'albero dell'ulivo o vecchie macine in pietra. Un trattamento illecito più difficile da scoprire è l'aggiunta in percentuali inferiori al 20% di olio di semi di nocciola di provenienza turca o oli spagnoli o extracomunitari "deodorati".

Tra i latticini, le mozzarelle hanno assunto un particolare rilievo sotto il profilo delle frodi alimentari. Questo prodotto viene trattato con l'impiego di "caseine industriali magre" o di "latte in polvere ad uso zootecnico". Le mozzarelle sottoposte a questo trattamento non si distinguono da quelle genuine se non tramite analisi chimico-fisiche per la determinazione della quantità e dei tipi di grassi presenti. Le mozzarelle e gli altri latticini a denominazione di origine tipica o protetta o garantita vengono in alcuni casi trattati con l'utilizzo di cagliate di origine estera, spesso provenienti dai paesi dell'Est quali la Lettonia, l'Ungheria, la Polonia e di altri Paesi CE.

Per quanto riguarda i formaggi, le più frequenti frodi hanno interessato:

- formaggi ottenuti con latte in polvere ricostituito;
- formaggi pecorini contenenti percentuali più o meno elevate di latte vaccino;
- mozzarella di bufala contenente percentuali più o meno elevate di latte vaccino;
- aggiunta di grassi, soprattutto margarina, per ottenere il quantitativo richiesto per un particolare formaggio;
- aggiunta di fecola o di farina di patate per aumentare il peso del prodotto;

- attribuzione della designazione di formaggio DOP a formaggi comuni;
- aggiunta di pectine, gomme viniliche, sostanze coloranti o minerali non consentiti.

Anche il latte è stato oggetto di “attenzioni” da parte di alcuni produttori senza scrupoli attraverso comportamenti caratterizzati da diversi livelli di pericolosità.

Si fa riferimento:

- l’annacquamento con o senza salagione e scrematura;
- la ricostituzione di latte in polvere;
- il latte inacidito neutralizzato con l’aggiunta di alcali;
- l’aggiunta di acqua ossigenata (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) per ridurre la carica batterica elevata.
- Tra i casi caratterizzati da maggiore pericolosità si ricorda il caso del famigerato “latte con melanina” che in Cina ha colpito diverse decine di bambini (2008), comportando almeno quattro decessi. Nel particolare caso, il latte destinato ai bambini era stato addizionato con una pericolosa sostanza di sintesi chimica (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>) al fine di celare una iniziale frode consistente nella diluizione delle derrate con acqua e quindi con lo scopo di controbilanciare la conseguente riduzione del naturale valore proteico.

Altra diffusa tipologia di frode è quella che interessa il pane e la pasta soprattutto:

- per quanto attiene la vendita di pane a pezzi e non a peso (frode commerciale);
- la vendita di pane ricco di umidità e pertanto più pesante per non essere stato portato alla cottura dovuta;
- alla vendita di pane speciale con l’impiego di grassi diversi da quelli consentiti;
- alla vendita di pasta di semola di grano duro ottenuta con la miscelazione di sfarinati di grano tenero.

Da ultimo, ma non certo per frequenza o rilevanza della frode, si fa riferimento alle carni dove si registra la vendita:

- di carni provenienti da animali ingrassati con sostanze non consentite

(ormoni, tireostatici, stilbenici, beta-agonisti). In questo caso le carni sono ricche di acqua e si riducono notevolmente dopo la cottura;

- di carni contenenti residui di medicinali il cui trattamento non è stato dichiarato e senza l'osservanza di sospensione tra il trattamento stesso e l'avvio alla macellazione;
- di carni della stessa specie, ma di qualità diversa (vitello adulto per vitello);
- di tagli meno pregiati per tagli pregiati (es. lombata del quarto anteriore per lombata del quarto posteriore o filetto);
- di carni di specie diverse da quelle dichiarate;
- di insaccati dichiarati prodotti con carni di una sola specie (es. suino), ma contenenti carni di più specie animali meno costose, come pollo e tacchino;
- di prodotti generici commercializzati come prodotti a marchio DOP.

## **1.6 TRACCIABILITÀ**

Uno dei punti di forza del sistema produttivo italiano è costituito dalla straordinaria gamma e varietà di prodotti agroalimentari. Tra questi, i prodotti tipici e tradizionali costituiscono un settore portante e addirittura vitale, non tanto per quanto riguarda numero di aziende e di addetti, ma soprattutto perché ciascun prodotto, sviluppatosi e affermato in rapporto a precisi ambiti territoriali e contesti sociali, economici e culturali, rappresenta di per sé un valore.

Nell'elenco nazionale previsto dal DM 350/1999 risultano inseriti al momento 1.424 prodotti tradizionali riferiti ad alimenti di origine animale (il 58% del totale), 689 dei quali derivati da carni, 585 da latte e 98 ittici. Alcuni di questi prodotti di origine animale sono prodotti "mono-razza" cioè ottenuti dalle produzioni di animali appartenenti alla stessa razza e rappresentano importanti elementi per la salvaguardia e la valorizzazione di queste popolazioni animali, dei territori, a volte marginali, e delle tradizioni. La trasparenza circa l'origine dei prodotti alimentari, ed in particolare dei prodotti animali, è ormai considerata una componente importante della qualità e della sicurezza, così come viene percepita dai consumatori. Inoltre, rappresenta un importante elemento per la competitività e la valorizzazione di questi prodotti nei mercati sia a livello locale, che a livello nazionale e internazionale oltre

che per la difesa degli stessi produttori da imitazioni e contraffazioni che potrebbero danneggiare dal punto di vista economico l'intera filiera e minare la fiducia dei consumatori.

Nel settore delle produzioni animali per tracciabilità si intende la capacità di mantenere il controllo dell'origine dei prodotti e dell'identità degli animali lungo i diversi passaggi della filiera, dall'allevatore alla vendita al dettaglio (UNI/EN/ISO 22005).

La necessità di mettere a punto sistemi efficaci ed economici per tracciare i prodotti di origine animale ha assunto un'importanza sempre maggiore da quando la globalizzazione del commercio e l'industrializzazione dei processi produttivi hanno reso impossibile il controllo diretto della produzione alimentare da parte dei consumatori.

La tracciabilità, oltre a fornire un sistema di controllo per l'igiene e la sicurezza degli alimenti, permette di garantire il consumatore da possibili frodi, salvaguardare categorie a rischio (come ad esempio persone che soffrono di allergie o di intolleranza a particolari alimenti o additivi) e tutelare scelte alimentari individuali per motivi religiosi o salutistici.

Per quanto riguarda le scelte religiose si riscontrano un volume ed un valore degli scambi in continua crescita di carne halal e kosher, si è stimato nei paesi musulmani un giro di affari di questi prodotti per 57.2 miliardi di dollari. La certificazione kosher apparentemente ha un bacino di utenza limitato (la comunità italiana di religione ebraica è composta da circa 50 mila persone), ma permette di essere più competitivi in chiave di export; tale certificazione, per molti consumatori stranieri, non necessariamente di religione ebraica, è garanzia di qualità, salubrità, sicurezza alimentare, dal momento che il processo produttivo avviene sotto il controllo dei rabbini in tutte le sue fasi. Per gli ebrei sono consentite le carni dissanguate di tutti i ruminanti con gli zoccoli fessurati, come bue e montone, di animali acquatici con pinne e scaglie, di volatili (esclusi alcuni, come i rapaci, esplicitamente proibiti) mentre non sono consentite le carni di animali carnivori, di maiale e i frutti di mare (Farouk *et al.*, 2013; Gorni, 2008).

Analoga situazione per i prodotti certificati halal, destinati al mercato dei consumatori musulmani, ma non solo. Il rispetto delle leggi italiane ed europee in

materia di igiene, sicurezza alimentare e benessere animale è imprescindibile al fine del rilascio di questa certificazione, che si ottiene quando il processo produttivo è totalmente controllato dagli imam; secondo il Corano tutti i cibi sono halal ad eccezione delle carni di animali già morti prima della macellazione, di maiale, di animali macellati senza invocare Dio (Farouk *et al.* 2013; Gorni, 2008).

Inoltre, la possibilità di verificare con sistemi oggettivi l'origine dei prodotti animali accresce il valore della certificazione di qualità, come ad esempio i prodotti IGP o DOP, favorendo lo sviluppo di aree ad economia marginale attraverso la valorizzazione di prodotti tipici e di nicchia e fornendo incentivi alla conservazione di razze locali mantenendo la biodiversità. Per far fronte alla difficile situazione venutasi a creare a seguito della crisi BSE, il Parlamento Europeo ha emanato il Regolamento CE 1760/2000 riguardante il sistema d'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carne, al fine di identificare la carcassa, il quarto, i tagli di carne, il singolo animale oppure il gruppo di animali.

Il rilevamento di tessuti animali nei mangimi ha quindi acquisito grande interesse negli ultimi anni. Sono state utilizzate tecniche biomolecolari in quanto presentano indubbi vantaggi, come avere un alto grado di specificità e la possibilità di essere applicate anche a prodotti trasformati col calore (Momcilovic D., 2000). Sebbene il DNA, come le proteine, subisca denaturazione termica, è stato osservato che può essere ancora rilevabile tramite la PCR (Meyer R., 1996). La PCR è stata applicata per la rilevazione di tessuti bovini in alimenti per animali (Kremar P., *et al.*, 2001; Myers M.J., *et al.*, 2001), mentre Lahiff *et al.* (2001) hanno sviluppato una PCR per riconoscere ovini, suini e pollame in DNA mangimi.

I notevoli progressi conseguiti dalla biologia molecolare nei vari settori della ricerca scientifica hanno aperto nuove prospettive nel campo della sicurezza alimentare, consentendo l'attuazione di controlli analitici in grado di innalzare i livelli di qualità igienico-sanitaria (food-safety) e merceologica (food-authenticity) dei prodotti destinati al consumo umano. Sul versante della food-authenticity, gli standard qualitativi proposti dalla recente normativa europea, in tema di sicurezza alimentare, hanno reso sempre più attuale il concetto di "tracciabilità degli alimenti, dei mangimi, e dei loro ingredienti" (regolamento CE n. 178/2002),

lungo tutta la filiera produttiva. In questo caso la “tracciabilità molecolare” derivante dall’identificazione di specie animali e vegetali, diventa uno strumento indispensabile per smascherare eventuali frodi perpetrate ai danni del consumatore, e per la certificazione di autenticità dei prodotti di origine controllata.

Nella rosa delle possibili applicazioni le più comuni sono:

- identificazione delle specie animali nell’industria dell’allevamento e nei prodotti a base di carni;
- identificazione di specie nel comparto ittico (tecnica DNA-barcoding o codice a barre genetico);
- controllo di autenticità delle varietà di uve e olive utilizzate nella produzione di vino e olio;
- identificazione delle semole di produzione della pasta tipica made in Italy;
- identificazione varietale, ovvero la verifica che la varietà commercializzata corrisponda a quella dichiarata (finalizzata alla protezione del costituente da possibili frodi);
- la tracciabilità di tossine batteriche o contaminanti fungini (le micotossine);
- la tracciabilità di OGM (Organismi Geneticamente Modificati).

Lo sviluppo dei marcatori molecolari e del “DNA profiling” fornisce uno screening rapido e a costi ridotti, oltre che potente, affidabile e ad alto contenuto informativo. Si parla quindi oggi di “tracciabilità molecolare” per indicare la possibilità di investigare la natura e l’origine di un prodotto finito tramite analisi del DNA, proteine o metaboliti.

### **1.7 Evoluzione della biologia molecolare per l’identificazione di specie**

Le tecniche di biologia molecolare hanno trovato negli ultimi anni una sempre più vasta applicazione nell’identificazione di specie negli alimenti di origine animale (Lasagna, 2005).

Studi specifici sono stati condotti per gli alimenti a base di carne, pesce e derivati del latte. In particolare la PCR trova un sempre più ampio utilizzo nel controllo delle

frodi dei prodotti lattiero caseari protetti dal marchio DOP. Tra questi la mozzarella di bufala campana è sicuramente tra i prodotti maggiormente a rischio di adulterazione per l'impiego, durante il processo di lavorazione, di latte di specie diversa da quella indicata dal disciplinare, a tale proposito il più utilizzato è il latte vaccino. Tali metodi sono l'HPLC (GU della Repubblica Italiana 11 Giugno 1996 n. 135) e l'IEF su poliacrilammide delle caseine dopo plasmolisi (Reg. CE 213 /2001). Il riscontro di latte diverso da quello contemplato nel disciplinare di produzione è reato di particolare gravità e si configura la frode in commercio. Entrambe le tecniche sopra menzionate, per quanto specifiche e sensibili, soffrono di tempi di esecuzione abbastanza lunghi, non consentono di analizzare un grosso numero di campioni contemporaneamente, e spesso necessitano di apparecchiature costose e sofisticate. Tuttavia bisogna considerarne alcuni limiti applicativi, primo fra tutti la PCR tradizionale è un test qualitativo che non consente di effettuare una valutazione quantitativa del DNA di partenza. Paradossalmente la sua estrema sensibilità può anche rappresentare un limite, in quanto la tecnica mette in evidenza anche solo tracce di DNA di specie diversa magari dovute a contaminazioni minime ed accidentali (anche in termini dello 0.5%) lungo la filiera, dal campo allo stabilimento di produzione passando per il trasporto e lo stoccaggio (Meyer *et al.*, 1995).

Tecniche biomolecolari sono ora largamente utilizzate per il controllo degli alimenti per il consumo umano e animale, ma tali tecniche possono anche presentare problemi e difficoltà specialmente nel caso di matrici eterogenee od alimenti sottoposti a trattamenti durante le fasi della lavorazione (Bottero, 2011).

### **1.7.1 PCR**

Il più comune metodo di ricerca in grado di produrre un numero elevato di copie di una specifica sequenza di DNA è la Polymerase Chain Reaction (PCR). Ideata da Kary Mullis alla metà degli anni '80, rivoluzionò la genetica molecolare rendendo possibile un tipo di approccio del tutto nuovo per lo studio e l'analisi dei geni.

Questa tecnica è altamente sensibile e specifica, in quanto permette la sintesi *in vitro* di segmenti di DNA bicatenario e l'amplificazione della sequenza target milioni di volte in poche ore; per questo motivo viene anche definita "amplificazione genica".

La reazione di amplificazione parte dalla capacità enzimatica della DNA polimerasi I di sintetizzare un secondo filamento partendo da un DNA stampo denaturato. In particolare, la miscela di reazioni deve comprendere i quattro desossiribonucleotidi, opportune concentrazioni saline e pH, oligonucleotidi che funzionano da inneschi o “primer” per l’attività enzimatica. Tipicamente, si utilizzano forme di DNA polimerasi termostabili, quali la Taq polimerasi, estratta al batterio *Thermus aquaticus*, che consentono di organizzare la reazione in ripetizioni cicliche. La reazione a catena della polimerasi si compone tipicamente di 30-50 cicli, ognuno dei quali presenta tre step:

1. Denaturazione (denaturation): il DNA bicatenario viene scisso in due filamenti monocatenari separati mediante riscaldamento a temperature vicine ai 94°C.
2. Fase di attacco (annealing): i due primers (oligonucleotidi specifici che vengono sintetizzati in laboratorio, grazie alla conoscenza della sequenza bersaglio) si legano alle porzioni di DNA monocatenario a loro complementari, mediante la formazione di legami a idrogeno.
3. Fase di allungamento (elongation): la Taq polimerasi si lega in corrispondenza dei primers ed utilizza i nucleotidi liberi per completare la sintesi, determinando così la polimerizzazione di nuove catene complementari.

Il principale criterio che determina la specificità della PCR è la scelta dei primers. Per assicurare l’unicità di amplificazione di una sequenza, il primer dovrebbe avere una lunghezza media vicina a 20 paia di basi (Barry A.J & Peter J.B., 1984). Primers troppo corti, infatti, sono poco specifici avendo alte probabilità di trovare diverse zone di complementarietà nel genoma.

Altri criteri influenzano la funzionalità di un primer, quali i rapporti adenina/timina (*A/T*) e guanina/citosina (*G/C*), la presenza di sequenze ripetute o complementari (Hemmer W., 1997).

Attualmente l’ottimizzazione delle sequenze oligonucleotidiche da utilizzare come primer per la PCR può essere facilitata dall’uso di appropriati programmi software (Meyer P., 1995).

Altri criteri metodologici per la realizzazione di un test di PCR, sono l’ottimizzazione dei diversi parametri della reazione di amplificazione, quali la concentrazione del DNA stampo, dei primer, dei sali, del numero di cicli della temperatura di annealing



(Mullis K.B. & Gibbs R.A. 1998; Wolcott M.J., 1992). È infatti importante l'uso di reagenti e protocolli standardizzati per la riproducibilità dei test di PCR (Mahoy J.B. *et al.*, 1994).

La qualità del DNA presente nei campioni è particolarmente importante per l'analisi in PCR. La lunghezza media dei frammenti di DNA presenti nel campione di prova è un importante parametro di qualità del DNA; infatti è essenziale che la dimensione media dei frammenti di DNA nel campione non sia significativamente più piccola della sequenza bersaglio nelle analisi.

La degradazione del DNA presente nel campione da testare, nel caso specifico di alimenti, dipende soprattutto dai processi chimici, fisici o enzimatici che esso subisce durante la trasformazione tecnologica.

È importante inoltre che le metodiche di estrazione assicurino l'assenza di inibitori della PCR in quanto la presenza di inibitori co-estratti insieme al DNA è uno dei maggiori problemi nelle successive analisi del campione; gli inibitori della PCR comprendono composti organici e fenolici, glicogeno, grassi, collagene (Wilson *et al.*, 1997; Sholz *et al.*, 1998).

### **1.7.2 Sviluppi della PCR quantitativa**

La reazione a catena della polimerasi (PCR), a partire dalla sua introduzione nel 1985, è il metodo correntemente utilizzato per l'amplificazione di acidi nucleici ed ha assunto un ruolo di preminenza nella diagnostica medica e nell'analitica in generale (Saiki R.K., Higuchi R., *et al.*, 1998). Tuttavia, le caratteristiche stesse della reazione di amplificazione non ne consentono un utilizzo per la quantificazione della sequenza target presente inizialmente nel campione (Ferrè F., *et al.*, 1994). Infatti, possono influenzare notevolmente i prodotti finali della reazione, piccole differenze nell'efficienza di amplificazione, quali la qualità e la concentrazione della Taq polimerasi, dei dNTPs, del MgCl<sub>2</sub>, dei primers e dei cicli della reazione.

Altre variabili imprevedibili, essenzialmente legate alla qualità del DNA stampo, possono alterare il risultato finale dell'amplificazione. Il crescente interesse nelle applicazioni quantitative della PCR ha quindi favorito la proposta di diversi tipi di saggi (Diviacco *et al.*, 1992).

La PCR quantitativa è una tecnica basata sulla reazione a catena della polimerasi che è in grado di misurare la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione biologico (Orlando *et al.*, 1998).

In particolare la PCR quantitativa competitiva e la PCR Real Time hanno trovato numerose applicazioni, in primo luogo nell'ambito della diagnostica medica, con recenti applicazioni nelle indagini analitiche degli alimenti; la presenza di carne di suino in miscele di carne fresca di suino e manzo è stata identificata per la prima volta nel 1994 da Meyer *et al.*, utilizzando la metodica della PCR con primer specifici disegnati sul gene suino codificante l'ormone della crescita, tracce di maiale sono state rilevate con una soglia del 2% (w/w).

La necessità di adeguarsi alle direttive legislative europee ed italiane, che l'obbligo di rispettare i criteri relativi alla lavorazione del prodotto, ha reso necessario la predisposizione di metodiche analitiche in grado di rilevare la presenza in termini percentuali. Attraverso la tecnica PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) con primer specifici per il gene mitocondriale del citocromo b il limite di rilevazione della carne di suino in preparati di carne di manzo è stato abbassato ulteriormente, permettendo di rilevare tracce di maiale fino al 1% (w/w). (Meyer *et al.*, 1995). Oggi l'analisi del gene codificante il citocromo b è stato universalmente adottata per identificare specie animali e aviarie nei prodotti di macellerie e nei prodotti ittici (Aida *et al.*, 2007; Che *et al.*, 2007). questo gene localizzato nel DNA mitocondriale è multicopia, presente quindi il vantaggio di essere facilmente identificabile, i mitocondri sono inoltre più resistenti al processamento termico tipico delle preparazione industriali (Wolfe and Primorse, 2004).

### **1.7.3 PCR Real-Time**

L'evoluzione della tecnica di PCR proposta dal saggio Taq Man permette oggi una drastica riduzione dei tempi di esecuzione e del materiale consumato utilizzando un solo strumento ed eliminando completamente l'impiego di reagenti radioattivi o tossici. Comparato alle PCR tradizionali, il test non solo mantiene spiccate caratteristiche di sensibilità, ma garantisce anche decisivi miglioramenti in termini di

specificità, di precisione e di intervallo di quantificazione del campione incognito. Questi vantaggi sono dovuti all'innovativo sistema di rilevamento e misurazione "in tempo reale" del DNA amplificato, che consente sia di ridurre il numero delle repliche necessarie alla determinazione di ogni campione, sia di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, che rappresentano potenziali fonti di alterazione dei risultati, ed inoltre è dotata di elevata sensibilità (López-Calleja *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Kesmen *et al.*, 2009; Mininni *et al.*, 2009).

La tecnologia Real-Time PCR ha permesso lo sviluppo di approcci quantitativi basati sull'utilizzo di sonde TaqMan raggiungendo limiti di rilevazione pari a 0,80 pg di DNA target in miscele complesse (Lopez *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2006).

La prima determinazione in tempo reale dei prodotti di PCR è stata effettuata da Higuchi *et al.* (1992), con un sistema che includeva bromuro di etidio in ogni ciclo d'amplificazione, una fonte di raggi ultravioletti che irradiava i prodotti d'amplificazione ed una CCD camera che catturava l'emissione di fluorescenza, successivamente elaborata attraverso un software dedicato a rilevare la quantità di DNA target. Con l'evolversi dei cicli la concentrazione degli amplificati aumenta, con conseguente incremento dell'emissione di fluorescenza. Rappresentando in un sistema di assi cartesiani le intensità di emissione in ascissa e il numero dei cicli in ordinata, si ottiene una curva che fornisce informazioni sulla quantità di DNA stampo originariamente presente nella reazione con un'approssimazione minore rispetto a quella derivabile da una PCR end point. Un ulteriore progresso verso lo sviluppo degli attuali sistemi si è in seguito avuto con l'evolversi della "chimica" della reazione. Intercalanti quali il bromuro di etidio hanno infatti il limite della aspecificità: si legano infatti sia ai prodotti d'amplificazione specifici, sia ad eventuali ampliconi aspecifici che vengono generati durante la reazione di PCR. In alternativa il saggio 5' nucleare da la possibilità di rilevare i soli prodotti specifici d'amplificazione. Tale saggio è stato per la prima volta proposto da Holland *et al.*, (1991) che dimostrarono come l'attività 5' nucleasica della Taq DNA polimerasi potesse essere utilmente sfruttata per la determinazione dei soli prodotti target. In aggiunta ai classici componenti di una reazione PCR, tale saggio comprendeva una sonda marcata con  $^{32}\text{P}$  all'estremità in 5' e bloccata all'estremità in 3' in modo tale da non poter funzionare da primer. Durante l'amplificazione, l'appaiamento della sonda

alla sua sequenza target generava un substrato che veniva distrutto dall'attività 5' nucleasica della Taq polimerasi quando l'enzima copiava il secondo filamento a partire da un primer disegnato a monte della sonda. A reazione PCR terminata, la quantità di sonda degradata veniva terminata attraverso cromatografia su strato sottile.

Un ulteriore avanzamento della metodica analitica si è avuto ad opera di Lee *et al.*, (1993) che hanno eliminato la necessità di determinare la quantità di sonda degradata attraverso analisi post-PCR. Questi autori hanno infatti realizzato un tipo di sonda caratterizzata da un oligonucleotide dotato sia di un fluorocromo reporter che di un quencher. Quando la sonda è integra, la vicinanza tra il reporter e il quencher riduce la fluorescenza emessa a causa della legge di Forster.

Nell'attuale PCR Real Time con sonde tipo TaqMan l'estensione dei primer durante la reazione PCR produce fluorescenza. Se infatti la sequenza target è presente nella miscela di reazione, la sonda TaqMan si appaia a valle del sito di attacco del primer e durante l'estensione dei primer, viene degradata dall'attività 5' nucleasica della Taq polimerasi. Tipicamente, una sonda TaqMan contiene FAM (6 carboxy-fluorescein) come reporter fluorescente legato covalentemente all'estremità in 5' e TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) legata covalentemente all'estremità 3'. La degradazione della sonda non può avvenire quando questa è libera in soluzione, ma esclusivamente dopo annealing ai frammenti di neo-sintesi, per la citata attività 5' nucleasica, e corrisponde ad emissione di fluorescenza, per la separazione tra la molecola del reporter e del quencher.

Il vantaggio di un sistema di questo tipo sta essenzialmente nella specificità della sonda, capace di legarsi solo ad ampliconi specifici. La possibilità di utilizzare diversi tipi di fluorocromi per mancare sonde diverse, consente inoltre di rilevare più di una sequenza target in una sola reazione, realizzando così una reazione in multiplex. Uno svantaggio sta invece nell'obbligo di sintetizzare, per ogni target, una sonda *ad hoc*. In aggiunta alle sonde TaqMan sono state proposte e brevettate altri tipi di sonde, quali FRET (Forster resonance energy transfer), SunRise, molecular beacons, Scorpions. In alternativa alle sonde fluorogeniche l'accumulo di amplificati si può seguire in Real Time utilizzando coloranti specifici del DNA con i seguenti vincoli: capacità di emettere fluorescenza crescente all'aumentare degli amplificati

legati e capacità di non interferire in alcun modo nell'evolversi della reazione PCR.

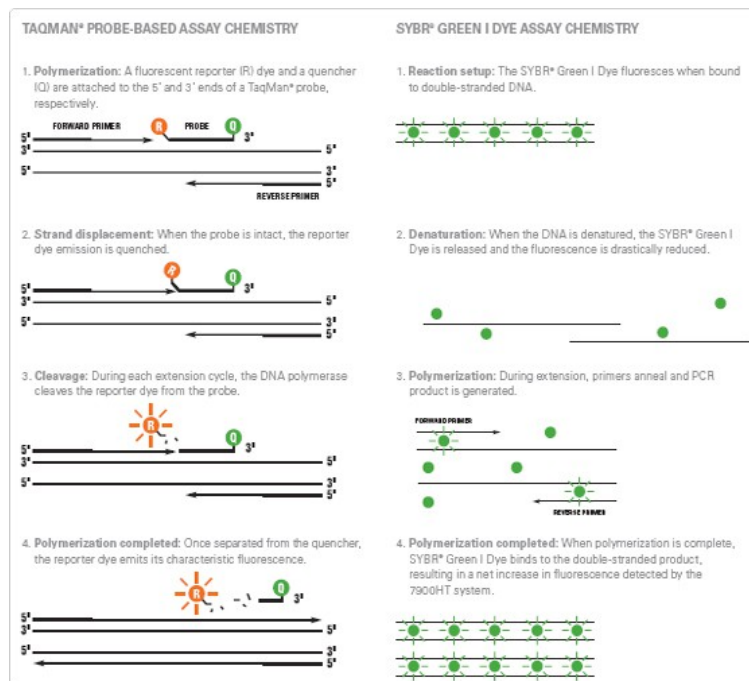


Figura 1: Chimica Taqman e chimica SYBR

Un colorante dotato di queste caratteristiche è il SYBR® Green I (Applied Biosystem), con sensibilità paragonabile a quella del bromuro di etidio. Il SYBR®; il SYBR Green I si lega anche a prodotti di amplificazione aspecifici eventualmente generati durante la reazione (Fajardo *et al.*, 2008; Farrokhi *and* Joozani, 2011). Gli strumenti per PCR Real Time, oltre a fungere da termociclatori, eccitano, durante la PCR con un laser a ioni argon o con lampade al tungsteno, i fluorocromi presenti nei campioni e convogliano quindi la fluorescenza emessa in risposta lungo fibre ottiche fino ad uno spettrografo che provvede a separare le componenti del reporter e del quencher. Appositi software acquisiscono lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e convertono la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. In maggiore dettaglio, l'algoritmo di analisi calcola l'emissione del reporter (R) e del quencher (Q) ogni pochi secondi. I valori di Rn riflettono la quantità di sonda fluorescente degradata e possono essere rappresentati in un grafico in funzione del numero dei cicli. Contemporaneamente, l'algoritmo determina il ciclo soglia che corrisponde ad effettiva emissione di fluorescenza, scorporata dal rumore di fondo. Il

calcolo della quantità di DNA dei campioni incogniti viene effettuata determinando il ciclo della PCR (ciclo soglia, Ct) in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter che separa i segnali di amplificazione specifici da quelli del rumore di fondo del sistema. Il numero dei cicli necessari perché un campione raggiunga il suo Ct è inversamente proporzionale al numero di copie target presente inizialmente. Una curva di referenza costruita con i Ct di campioni standard a contenuto di DNA noto in funzione del logaritmo della relativa quantità di DNA, consente poi l'estrapolazione del contenuto di DNA nei campioni incogniti.

Il vantaggio in termini di precisione e di intervallo di quantificazione rispetto alla PCR tradizionale, è dovuto alla possibilità di quantificare il DNA al ciclo soglia, che è sempre calcolato nella fase esponenziale della reazione PCR, fase in cui i reagenti sono ancora lontani dall'esaurimento e gli elementi di variabilità sono così ridotti al minimo.

## **1.8 L'IMPORTANZA DELLA VALIDAZIONE DEL METODO**

La validazione di una metodica è un aspetto focale, per il laboratorio interessato, poiché è condizione imprescindibile per poter essere accreditato ed essere garanzia di:

- imparzialità;
- indipendenza, ovvero assicurare l'assenza di conflitti di interesse con l'organizzazione da certificare;
- correttezza;
- competenza del personale qualificato;

Secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 la validazione è la conferma attraverso esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista sono soddisfatti; tanto maggiore è il grado di convergenza fra quanto ottenuto e quanto atteso, tanto maggiore risulta essere il grado di validità del procedimento.

La validazione di un metodo può essere eseguita attraverso degli studi collaborativi con altri laboratori, quando il metodo è di larga applicazione, oppure può avvenire in "in-house" in quelle situazioni in cui il metodo non può essere diffuso oppure non

ampiamente utilizzato. È molto importante validare un metodo in quanto durante un'analisi vi sono molteplici variabili che possono inficiare l'esito del risultato.

Tra le variabili da prendere in considerazione vi è l'estrazione del DNA, che può essere critica quando il campione non è rappresentativo, la scelta del gene-target, alimenti che possono contenere sostanze inibitrici della PCR e contaminazioni involontarie.

Il metodo utilizzato e validato nell'identificazione di specie in alimenti è la PCR Real-Time in quanto è caratterizzata da una maggiore sensibilità ( $10^7$  volte più preciso rispetto ai metodi classici) e specificità (possibilità di utilizzare sonde altamente specifiche); inoltre la Real-Time è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, presenta ridotti tempi di analisi e al termine della reazione di amplificazione non è richiesta nessuna manipolazione (elettroforesi o blotting).

Inoltre è molto importante determinare e quantificare un valore di cut-off per le specie in esame, dovuto al fatto che la Real-Time essendo una metodica altamente sensibile risulta fondamentale avere un punto di riferimento per poter considerare se un campione sia realmente positivo o negativo. Questo perché in molti casi si può osservare dei campioni in cui vi sia la presenza di un quantitativo irrisorio di una specie non dichiarata che potrebbe essere più una causa dovuta ad una disattenzione del produttore oppure a contaminazioni ambientali che ad una azione fraudolenta volta ad ingannare il consumatore.

Per cui viene definito un valore soglia dell'1%; risultato inferiori a questo valore si può considerare che il livello 1% della frazione di massa non è superato, in caso contrario, ovvero un risultato superiore all'1%, si può considerare che il livello 1% della frazione di massa sia superato.





## **2. SCOPO DELLA TESI**

Gli alimenti a base di carne occupano nel comparto produttivo agroalimentare italiano, in generale, un posto di notevole importanza. Nel corso degli ultimi anni, ed in seguito a frequenti allarmi nel settore alimentare, si è vista la necessità di una estensione delle tutele previste a tutti gli anelli della filiera alimentare. L'esigenza di mettere a punto sistemi efficaci ed economici per tracciare i prodotti di origine animale ha assunto un'importanza sempre maggiore da quando la globalizzazione del commercio e l'industrializzazione dei processi produttivi hanno reso impossibile il controllo diretto della produzione alimentare da parte dei consumatori. La tracciabilità, infatti, oltre a fornire un sistema di controllo per l'igiene e la sicurezza degli alimenti, permette di garantire il consumatore da possibili frodi, salvaguardare categorie a rischio (come ad esempio persone che soffrono di allergie o di intolleranza a particolari alimenti o additivi) e tutelare scelte alimentari individuali per motivi religiosi o salutistici.

Il metodo attualmente più applicato nell'identificazione di specie in alimenti è la PCR Real-Time in quanto caratterizzato da una maggiore sensibilità e specificità, e presenta tempi ridotti di analisi.

Proprio a causa della grande sensibilità della metodica si rende necessario uno strumento di interpretazione (un cut-off) che consenta di definire la presenza effettiva di una specie animale in un alimento distinguendola dalla presenza in tracce che non risulta in etichetta in quanto non considerata ingrediente. Il cut-off è stato stabilito in un valore del 1% dall'EURL (European Union Reference Laboratory for GM Food & Feed).

Lo scopo di questa tesi è stato l'applicazione della metodica di biologia molecolare Real-Time PCR, con l'utilizzo del Sybr-Green, per definire il cut-off che consenta l'interpretazione dei risultati delle analisi, e per l'identificazione di specie animali in matrici alimentari a base di carne commercializzati sul territorio italiano, al fine di verificare la corrispondenza con quanto dichiarato in etichetta che rappresenta anche nel settore alimentare, sia umano che animale, un ottimo strumento di analisi per evidenziare eventuali frodi legate alla vendita di "aliud pro alio".

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Campo di applicazione e campioni di riferimento

L'identificazione di specie in un alimento o mangime di origine animale permette di stabilire le specie animali di cui è composto. Il metodo descritto è applicabile ad alimenti di origine animale crudi e/o cotti in analisi qualitativa. L'analisi viene eseguita mediante Real Time PCR utilizzando primers specifici per le seguenti diverse specie da ricercare:

| SPECIE                                    | AMPLICONI | GENE TARGET |
|---|-----------|-------------|
| Bovino ( <i>Bos taurus</i> )              | 112 bp    | 16 s        |
| Maiale ( <i>Sus scrofa</i> )              | 112 bp    | Cyt b       |
| Pollo ( <i>Gallus gallus</i> )            | 82 bp     | Cyt b       |
| Tacchino ( <i>Melagris gallopavo</i> )    | 75 bp     | Cyt b       |
| Cavallo ( <i>Equus caballus</i> )         | 81 bp     | Cyt b       |
| Cane ( <i>Canis lupus</i> )               | 101 bp    | 12s         |
| Gatto ( <i>Felis silvestris catus</i> )   | 108 bp    | 12s         |
| Pecora ( <i>Ovis aries</i> )              | 104 bp    | 16s         |
| Capra ( <i>Capra hircus</i> )             | 113 bp    | Nadh-2      |
| Coniglio ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) | 120 bp    | Nadh-1      |
| Bufalo ( <i>Bubalus bubalis</i> )         | 153 bp    | Cyt b       |
| Cervo ( <i>Cervus elaphus</i> )           | 104 bp    | 12s         |

Tab. 1 : Specie ricercate (Bertasi, 2007; Martin, 2007; Jonker, 2008; Fajardo, 2011)

Inoltre è stato richiesto, a seconda delle analisi, di ricercare altre specie meno importanti commercialmente come cervo, bufalo, capra, cane, gatto, pecora e coniglio.

Sono stati utilizzati 184 campioni ufficiali costituiti da matrici differenti (es. carne misto bovino suino, cannelloni, kebab ecc. ) pervenuti presso Istituto Zooprofilattico delle Venezie nel periodo 2012-2013, più 21 campioni di pet-food costituiti anch'essi da matrici differenti (carne mista con riso e/o patate e varie farine). Sono stati inoltre utilizzati come materiali di riferimento, per le varie

specie ricercate, DNA estratti da carne a titolo di percentuale nota (100%-1%) creati in laboratorio e confermati con il sequenziamento.

La rilevazione degli amplificati è eseguita con SYBR Green I, una molecola in grado di intercalarsi nel DNA a doppia elica ed emettere fluorescenza, contenuto all'interno della mix di reazione.

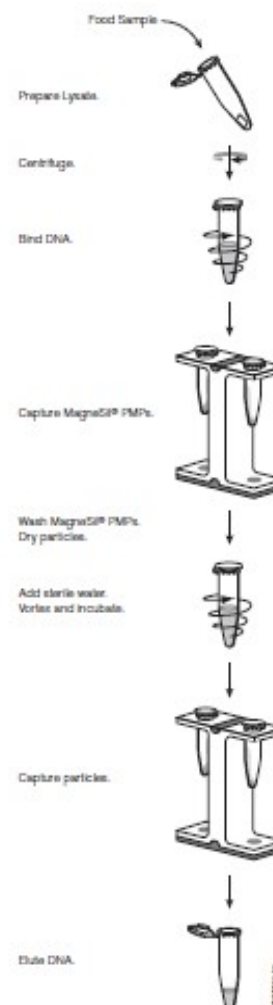
### 3.2 Protocollo di estrazione

La procedura di estrazione del DNA delle matrici in esame per l'analisi mediante Real-time PCR è stata realizzata attraverso l'impiego di un kit: Wizard Magnetic DNA Purification System for Food fornito dalla ditta Promega.

La procedura di estrazione del Dna prevede lo sminuzzamento meccanico del materiale di origine animale da esaminare (fig.1). Viene pesato 200 mg di materiale a cui vengono aggiunti 500 µl di Lysis Buffer A, un buffer lisante, e 5 µl di Rnasi-A per degradare l'RNA.

Successivamente vengono aggiunti 250 µl di Lysis buffer B, vortexati per 10-15 secondi e poi lasciati per 10 minuti a incubare a temperatura ambiente (22-25° C).

Si aggiungono 750 µl di Precipitation Solution, si mescola vigorosamente e si centrifuga per 10 min a 13000rpm. Si trasferisce il surnatante su una nuova eppendorf e si aggiunge 50 µl di Magnesil PMOs, che contiene delle piccole sferette magnetiche che hanno la capacità di legare il DNA, e si mescola per inversione. Si aggiunge un volume di 0,8 ml di isopropanolo, si inverte la provetta per 10-15 volte e si lascia incubare per 5 minuti a temperatura ambiente.



Le eppendorf vengono posizionate su un apposito supporto il MagneSphere Technology Magnetic Separation Stand e lasciate su questo per un minuto così le sfere hanno il tempo per rimanere adese alla parete, e si elimina la soluzione.

Si sposta la eppendorf dal supporto, si aggiungono 250 µl di Lysis Buffer B, per eliminare eventuali contaminanti o inibitori, e si riposiziona il tutto nel supporto e si rimuove la parte liquida.

Si eseguono tre lavaggi, in modo da eliminare proteine, polissaccaridi e gli eventuali contaminanti, con 1 ml di etanolo al 70% e si lascia la provetta ad asciugare a 65°C nel termoblocco.

Infine, il DNA puro viene eluito con 100 µl di nuclease-free water mescolato, lasciato per 5 minuti ad incubare a 65°C nel termoblocco.

Successivamente viene posizionato sul supporto magnetico per un minuto e si trasferisce il DNA in una nuova eppendorf, facendo attenzione a non venire in contatto con le sfere (PROMEGA,2012).

### **3.3 Dosaggio del DNA estratto**

La concentrazione del DNA estratto si può accuratamente misurare mediante la spettrofotometria di assorbanza degli ultravioletti (UV): la quantità di radiazione UV assorbita da una soluzione di DNA è direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione.

L'assorbanza viene misurata a 260 nm, che corrisponde alla lunghezza d'onda a cui un'assorbanza ( $A_{260}$ ) di 1,0 corrisponde 50 µg di DNA a doppio filamento per ml.

Solitamente per una buona quantità della reazione di PCR per l'identificazione di specie sono indicati valori che variano tra i 10 ed i 20 ng/ul.

Per verificare la purezza di un campione, si esegue un rapporto di assorbanza a 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) che deve variare tra 1,5 ed 1,8: rapporti inferiori indicano contaminazioni da proteine, fenoli o un'errata estrazione. Inoltre si calcola il rapporto delle assorbanze a 260 nm e a 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ) che dà indicazioni sulla presenza di sostanze quali carboidrati, fenoli e composti peptidici o aromatici. Per ogni estratto è stato quantificato il DNA tramite un'analisi

effettuata con lo spettrofotometro Eppendorf Biophotometer.

È stata rilevata la concentrazione dell'acido nucleico di ciascun campione e sono stati misurati i rapporti dell'assorbanza  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{280}$  e l'assorbanza a 260 nm.

Considerando che l'assorbanza, secondo la legge di Lambert-Beer, è direttamente correlata alla concentrazione di una soluzione, la concentrazione di DNA è stata calcolata moltiplicando l'assorbanza per 50 ug/ml, per il Fattore di Diluizione applicato (FD):

$$\text{DNA} = A (50 \text{ ug/ml}) \text{ FD}$$

### 3.4 Preparazione della mix di reazione e caricamento

Una volta ottenuto l'estratto di DNA si prepara la mix di reazione per la specie da ricercare, che prevede l'utilizzo di una piastra in plastica a 96 pozzetti (Optical 96-Well Fast Plates-Applied Biosystem).

Composizione della mix di reazione:

- H<sub>2</sub>O
- Power SYBR Green PCR M.Mix (Applied Biosystem)
- Primer forward
- Primer reverse

|              |                                    |
|--------------|------------------------------------|
| Primer Bov-F | 5'-CTTGAAGTACCTAGCCCAAAGATAC-3'    |
| Primer Bov-R | 5'-GCGCCGTACTTAGATTCTATCTCC-3'     |
| Primer Mai-F | 5'-ATGACCAACATCGAAAATCAC-3'        |
| Primer Mai-R | 5'-TGCCTAAGAGGGAACCGAAG-3'         |
| Primer Gal-F | 5'- TCTCACTTACACTACTTGCCACATCTT-3' |
| Primer Gal-R | 5'-CGTGTGTGTCCTGTTTGGACTAG-3'      |
| Primer Tac-F | 5'-CCGTAACCTCCATGCGAATG-3'         |
| Primer Tac-R | 5'-TAATATAGGCCGCGTCCAATGT-3'       |
| Primer Cav-F | 5'- GCATCGGGGATATCGGC-3'           |
| Primer Cav-R | 5'-GGAGTCAAATTGAGCGG-3'            |

Tab. 2: Primer utilizzati per le specie più importanti commercializzate (Bertasi, 2007; Joker, 2008)

|              |   |
|--------------|---|
| Primer Dog-F | 5'-AAT TGA ATC GGG CCA TGA A-3'               |
| Primer Dog-R | 5'-CTC CTC TTG TGT TTT AGT TAA GTT AAT CTG-3' |
| Primer Cat-F | 5'-CGA CTT ATC TCC TCT TGT GGG TGT-3'         |
| Primer Cat-R | 5'-AAT TGA ATC GGG CCA TGA A-3'               |
| Primer Pec-F | 5'-CCA AAA TCT CCC ACT CTC CA-3'              |
| Primer Pec-R | 5'-GGT GAT GAG GAC TAG GGT TG-3'              |
| Primer Cap-F | 5'-CCA TGA CCT CCA CTA TAT TTT T-3'           |
| Primer Cap-R | 5'-GGT GAT GAG GAC TAG GGT TG-3'              |
| Primer Buf-F | 5'-CTTCCTATTCGCATACGCAATCTTACGATC-3'          |
| Primer Buf-R | 5'-TATGATGTTCCGGCCATT CAGCCAATGCC-3'          |
| Primer Cev-F | 5'-CAA AAACATATAACGAAAGTAACT TTCCGA CC-3'     |
| Primer Cev-R | 5'-AGTACTCTGGCGAATAGTTTTGTCTGCA-3'            |
| Primer Con-F | 5'-CCCCTAACATCCTCTCCG C-3'                    |
| Primer Con-R | 5'-AGAATGCCTATATTTAGGTTGAC-3'                 |

Tab. 3: primer utilizzati per specie meno ricercate: cane, gatto, pecora, capra, bufalo, cervo e coniglio (Bertasi, 2007; Martin, 2007; Joker, 2007; Fajardo 2011)

### Composizione delle mix di reazione

| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>P<br>O<br>L<br>L<br>O |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|--|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |  |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |  |
| Primer GAL-F<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
| Primer GAL-R<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
|                       | Volume totale   | 20                |             |  |
|                       | Volume campione | 5                 |             |  |
|                       | Volume finale   | 25                |             |  |

| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>T<br>A<br>C<br>C<br>H<br>I<br>N<br>O |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|---|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |   |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |   |
| Primer TAC-F<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |   |
| Primer TAC-R<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |   |
|                       | Volume totale   | 20                |             |   |
|                       | Volume campione | 5                 |             |   |
|                       | Volume finale   | 25                |             |   |

| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>M<br>A<br>I<br>A<br>L<br>E |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|---|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |   |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |   |
| Primer MAI-F<br>20 ul | 400 nmol/ul     | 0,5               | 0           |   |
| Primer MAI-R<br>20 ul | 400 nmol/ul     | 0,5               | 0           |   |
|                       | Volume totale   | 20                |             |   |
|                       | Volume campione | 5                 |             |   |
|                       | Volume finale   | 25                |             |   |

| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>B<br>O<br>V<br>I<br>N<br>O |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|---|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |   |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |   |
| Primer BOV-F<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |   |
| Primer BOV-R<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |   |
|                       | Volume totale   | 20                |             |   |
|                       | Volume campione | 5                 |             |   |
|                       | Volume finale   | 25                |             |   |

| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>E<br>Q<br>U<br>I<br>N<br>O |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|---|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |   |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |   |
| Primer GAL-F<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |   |
| Primer GAL-R<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |   |
|                       | Volume totale   | 20                |             |   |
|                       | Volume campione | 5                 |             |   |
|                       | Volume finale   | 25                |             |   |

| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>C<br>A<br>P<br>P<br>A |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|--|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |  |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |  |
| Primer CAP-F<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
| Primer CAP-R<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
|                       | Volume totale   | 20                |             |  |
|                       | Volume campione | 5                 |             |  |
|                       | Volume finale   | 25                |             |  |

| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>P<br>E<br>C<br>C<br>O<br>R<br>A |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|--|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |  |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |  |
| Primer PEC-F<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
| Primer PEC-R<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
|                       | Volume totale   | 20                |             |  |
|                       | Volume campione | 5                 |             |  |
|                       | Volume finale   | 25                |             |  |



| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>G<br>A<br>T<br>T<br>O |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|--|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |  |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |  |
| Primer CAT-F<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
| Primer CAT-R<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
|                       | Volume totale   | 20                |             |  |
|                       | Volume campione | 5                 |             |  |
|                       | Volume finale   | 25                |             |  |

| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>B<br>U<br>F<br>F<br>A<br>L<br>O |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|--|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |  |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |  |
| Primer BUF-F<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
| Primer BUF-R<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |  |
|                       | Volume totale   | 20                |             |  |
|                       | Volume campione | 5                 |             |  |
|                       | Volume finale   | 25                |             |  |

| Reagente              | Conc. Finale    | µl per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>C<br>A<br>N<br>E |
|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------|---|
| H2O                   | -               | 6,25              | 0           |   |
| Power SYBR GREEN      | 1X              | 12,5              | 0           |   |
| Primer DOG-F<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |   |
| Primer DOG-R<br>20 ul | 500 nmol/ul     | 0,625             | 0           |   |
|                       | Volume totale   | 20                |             |   |
|                       | Volume campione | 5                 |             |   |
|                       | Volume finale   | 25                |             |   |

| Reagente                         | Conc. Finale            | $\mu\text{l}$ per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>C<br>O<br>N<br>T<br>R<br>O<br>L<br>L<br>O |
|----------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------|--|
| H2O                              | -                       | 6,25                         | 0           |  |
| Power SYBR GREEN                 | 1X                      | 12,5                         | 0           |  |
| Primer CON-F<br>20 $\mu\text{l}$ | 500 nmol/ $\mu\text{l}$ | 0,625                        | 0           |  |
| Primer CON-R<br>20 $\mu\text{l}$ | 500 nmol/ $\mu\text{l}$ | 0,625                        | 0           |  |
|                                  | Volume totale           | 20                           |             |  |
|                                  | Volume campione         | 5                            |             |  |
|                                  | Volume finale           | 25                           |             |  |

| Reagente                                  | Conc. Finale            | $\mu\text{l}$ per 1 reazione | n. campioni | M<br>I<br>X<br><br>R<br>E<br>A<br>Z<br>I<br>O<br>N<br>E<br><br>C<br>E<br>R<br>V<br>V<br>O |
|---|-------------------------|------------------------------|-------------|---|
| H2O                                       | -                       | 6,25                         | 0           |   |
| Power SYBR GREEN                          | 1X                      | 12,5                         | 0           |   |
| Primer<br>12sceqfw-F<br>20 $\mu\text{l}$  | 300 nmol/ $\mu\text{l}$ | 0,625                        | 0           |   |
| Primer<br>12sceqrev-R<br>20 $\mu\text{l}$ | 300 nmol/ $\mu\text{l}$ | 0,625                        | 0           |   |
|   | Volume totale           | 20                           |             |   |
|   | Volume campione         | 5                            |             |   |
|   | Volume finale           | 25                           |             |   |

Preparata la mix di reazione per la specie da ricercare si aliquota 20  $\mu\text{l}$  di mix per pozzetto dedicato, l'analisi prevede un caricamento in doppio di ogni campione e l'aggiunta di un controllo positivo, un controllo negativo e controllo reagenti rPCR. Aliquotati i 20  $\mu\text{l}$  di mix, secondo lo schema indicato in tabella 4 si aggiunge 5  $\mu\text{l}$  di DNA estratto nel pozzetto corrispondente.

Sigillare la piastra con il film adesivo passando più volte con l'apposita spatolina per evitare la formazione di bolle o pieghe che inficino la lettura della fluorescenza.

|   |    |    |    |    |          |          |     |     |   |    |    |    |
|---|----|----|----|----|----------|----------|-----|-----|---|----|----|----|
|   | 1  | 2  | 3  | 4  | 5        | 6        | 7   | 8   | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | A1 | A1 | A2 | A2 | CTR<br>+ | CTR<br>- | NPC | NTC |   |    |    |    |
| B |    |    |    |    |          |          |     |     |   |    |    |    |
| C |    |    |    |    |          |          |     |     |   |    |    |    |
| D |    |    |    |    |          |          |     |     |   |    |    |    |
| E |    |    |    |    |          |          |     |     |   |    |    |    |
| F |    |    |    |    |          |          |     |     |   |    |    |    |
| G |    |    |    |    |          |          |     |     |   |    |    |    |
| H |    |    |    |    |          |          |     |     |   |    |    |    |

Tab. 4: esempio di distribuzione dei campioni nella piastra

Preparata la piastra si programma la PCR Real-Time, secondo le condizioni di amplificazione, avendo cura di selezionare per ogni pozzetto il canale di lettura della fluorescenza del fluorocromo utilizzato (SYBR Green I).

Condizioni di amplificazione:

- un primo ciclo a 50°C per 2 min;
- un secondo ciclo di iniziazione e di denaturazione del DNA a 95°C per 10 min;
- 42 cicli ripetuti che prevedono:
  - 94°C per 30 sec;
  - 60°C per 45 sec;
  - 72°C per 40 sec;
- infine uno step di dissociazione che prevede:
  - 95°C per 15 sec;
  - 60°C per 1 min;
  - 95°C per 15 sec;
  - 60°C per 15 sec;

### **3.5 Descrizione del sistema Real-Time PCR: Applied Biosystem 7500/7500 Fast Real-Time PCR System**

Lo strumento validato è l'Applied Biosystem 7500/7500 Fast Real-Time PCR System.

Questo strumento è composto da un termociclatore che ha la capacità di mantenere in modo ottimale la temperatura costante ed omogenea in tutti i pozzetti per non inficiare l'efficienza di reazione di PCR.

Il rilevatore dello strumento ha come sorgente una lampada a tungsteno che permette l'acquisizione in tempo reale della fluorescenza emessa dal DNA target. Il campione viene irradiato dalla sorgente e la fluorescenza emessa viene rilevata da una CCD camera, poi convertita in dati grafici e numerici da un algoritmo di deconvoluzione. L'eccitazione dei fluorocromi è ad opera della lampada a tungsteno che sfrutta l'impiego di filtri ottici. La CCD camera è raffreddata per limitare gli errori di rilevamento del segnale dovuti al "rumore" di fondo della camera stessa (Manuale per 7500 e 7500 Fast Real -Time PCR System).

Per normalizzare le fluttuazioni di fluorescenze non correlate alle reazioni di amplificazione, viene utilizzato un fluoroforo di riferimento interno detto anche controllo passivo (ROX), presente nel buffer di reazione.

Il software calcola, tramite un apposito algoritmo, i valori di  $\Delta R_n$  riferiti al ROX:

$$\Delta R_n = (R_{n+}) - (R_{n-})$$

Dove:

- $R_{n+}$  = (l'intensità di emissione del reporter)/(intensità di emissione del ROX)
- $R_{n-}$  = (l'intensità di emissione del reporter in assenza di stampo) /  
(intensità di emissione del ROX in assenza di stampo)

Tali valori riflettono la quantità di sonda fluorescente degradata e aumentando in modo esponenziale durante la reazione. Ad ogni ciclo viene rilevata la fluorescenza e registrati i dati su un diagramma di amplificazione dove sull'asse delle ordinate vengono riportati i valori di fluorescenza e sull'asse delle ascisse i cicli di reazione ( $C_t$ ).

I parametri che caratterizzano il grafico delle curve di amplificazione sono i

seguenti (Fig. 2):

- linea di base (baseline): linea orizzontale che indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di fluorescenza (di norma si fissa la baseline 3 cicli prima del ciclo in corrispondenza del quale la linea di soglia, threshold, incrocia la prima curva di amplificazione);
- linea di soglia (threshold line): linea parallela alla baseline che interpola le curve di amplificazione nella fase esponenziale, cioè dove i diversi profili di amplificazione risultano paralleli (può essere posizionata automaticamente dal software o autonomamente dall'operatore);
- ciclo soglia ( $C_t$ ) o threshold cycle: ciclo di PCR misurato per ciascun campione, in cui la curva di amplificazione interseca la linea soglia;

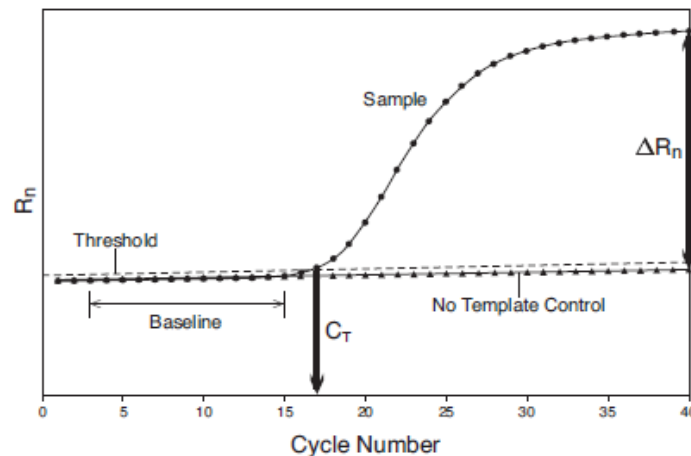


Fig.2: Curva di amplificazione in Real-Time PCR

I valori di  $C_t$  sono inversamente proporzionali al logaritmo del numero di copie iniziali del target, per cui è possibile risalire alla concentrazione di DNA dei campioni:

$$C_t : a \cdot \log(\text{nr. Copie}) + B$$

dove  $a$  è la pendenza e  $b$  l'intercetta di una retta di taratura ottenuta da materiali di riferimento a concentrazione nota (Fig. 3).

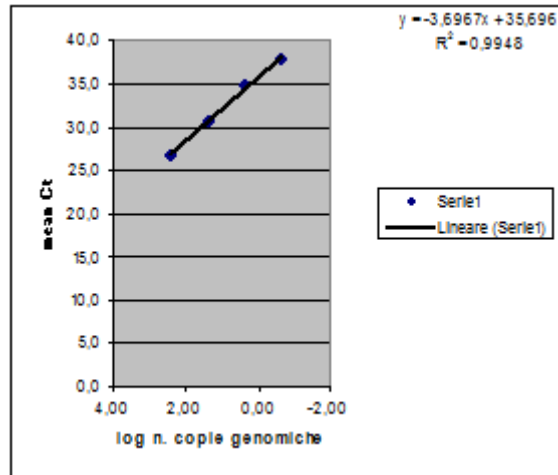


Fig. 3: esempio di una retta di taratura

Alla fine del profilo di amplificazione mediante uno step di dissociazione è possibile confrontare i diversi segnali e distinguere quelli derivanti dalla stessa specie da quelli di diverse specie o da artefatti, poiché ogni amplificato è caratterizzato da una curva di dissociazione e da una  $T_m$  (temperatura di melting) specifiche. Per avere la certezza che il segnale di amplificazione sia attendibile, cioè effettivamente derivato da amplificazione di DNA target, si osserva la curva di melting; se la curva di melting è sovrapponibile a quella del controllo positivo rPCR significa che si tratta dello stesso amplificato di DNA e che, ragionevolmente, il campione contiene quella specie (Fig. 4).

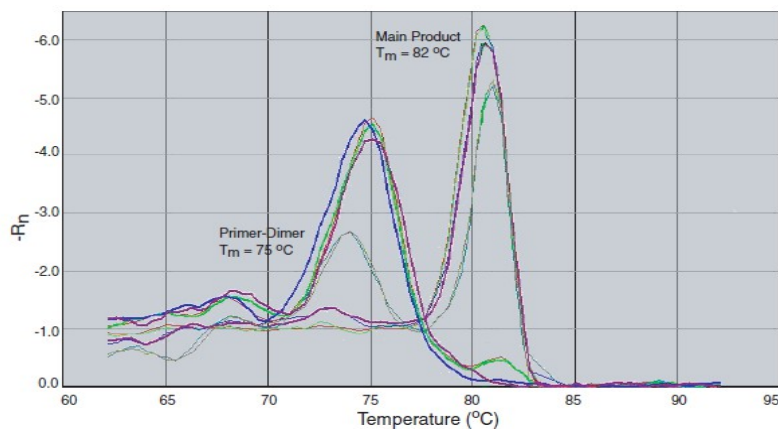


Fig. 4: Curva di dissociazione

### **3.6 Interpretazione dei dati**

La prova di amplificazione viene dichiarata conforme se i controlli predisposti danno i risultati attesi:

- controllo positivo di rPCR : curva di amplificazione
- controllo negativo di rPCR : assenza della curva di amplificazione

Il campione viene definito conforme se si rileva una curva di amplificazione simile a quello osservato nel controllo positivo e se la curva di melting è sovrapponibile a quella del relativo controllo positivo.

Il campione viene definito non conforme se non si rileva una curva di amplificazione simile a quella osservata nel controllo positivo e o se la curva di melting non è sovrapponibile a quella del relativo controllo positivo.

I campioni vengono testati in doppia estrazione e in duplicato.

Ogni estratto viene valutato singolarmente nei replicati seguendo lo schema seguente:

2 positività = campione positivo;

2 negatività = campione negativo;

1 positività e 1 negatività = campione dubbio e ripetizione dell'amplificazione.

### **3.7 CALCOLO CUT-OFF**

In ottemperanza alle indicazioni di EURL (European Union Reference Laboratory for GM Food & Feed) che stabilisce un cut-off all'1%, si sono effettuate delle analisi di campioni creati in laboratorio macinando le carni delle specie commercialmente più diffuse: es. 1 grammo di carine di cavallo tritata in 99 grammi di carne tritata di maiale, facendo attenzione a non mescolare specie affini come pollo/tacchino. Ottenuti i 100 grammi si è passati all'omogeneizzazione della carne per rendere il più possibile uniforme il materiale di riferimento.

Sono state eseguite 7 omogeneizzazioni:

- 1% bovino in 99% suino;
- 1% bovino in 99% pollo;
- 1% suino in 99% pollo;
- 1% pollo in 99% suino;
- 1% tacchino in 99% suino;
- 1% cavallo in 99% pollo;
- 1% cavallo in 99% suino;

Per ogni omogeneizzato sono state pesate 5 porzioni (200 mg.) adatte per il protocollo di estrazione (Wizard Magnetic DNA Purification System for Food-Promega).

Una volta ottenuto l'estratto è stato processato come da protocollo PCR e per ogni estratto sono state effettuate 3 repliche per cui sono state ottenute per ogni miscela di omogeneizzato 15 repliche (5 estrazioni per 3 repliche) per avere una buona stima nel definire il cut-off per ogni specie. Ottenuto questi dati sono stati confrontati con i dati ottenuti da campioni di DNA della specie target, 1%, diluito in DNA della specie non target 99% al fine di verificare se ci fossero discordanze tra i due approcci nella creazione di materiali di riferimento.

Secondo le indicazioni EURL per definire la presenza o meno di una specie in un campione si è così proceduto: si confronta (a parità di quantità di DNA analizzato) il Ct di un campione con i Ct ottenuti dal campione creato all'1% in frazione di massa di carne di una specie in un'altra specie.

Se il valore Ct del cut-off è superiore allora si può considerare che il livello 1% della frazione di massa non è superato; mentre se il valore Ct del cut-off è inferiore si può considerare che il livello di 1% della frazione di massa è superato.

I risultati ottenuti dai campioni all'1% di carne in carne sono stati confrontati statisticamente con i risultati dei campioni all'1% ottenuti diluendo DNA in DNA mediante un'analisi della varianza ad un fattore (*ANOVA, ANalysis Of VAriance*) tramite Microsoft Excel.



## **4 RISULTATI**

### **4.1 Determinazione cut-off**

Nell'analisi Real-Time per determinare il valore di cut-off si è voluto analizzare e quantificare il DNA ottenuto in due diverse modalità.

L'importanza nel definire il valore dell'1% risiede nel fatto che quantità minori di DNA di specie non presenti in etichetta non indicano nessun caso di frode ma solo la presenza di tracce.

Il confronto è stato eseguito tra:

DNA estratto da materiali di riferimento, (muscolo della specie in esame) con successiva diluizione dell'1% del DNA della specie target in 99% del DNA della specie non target;

DNA estratto dall'omogenizzazione delle carni triturate che prevedevano la preparazione dell'1% prima dell'estrazione.

I dati ottenuti sono osservabili nella tabella 5:

| BOV         |                 | MAI         |                 | POLLO       |                 | TACCHINO    |                 | CAVALLO     |                 |
|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
| DNA/<br>DNA | carne/<br>carne | DNA/<br>DNA | carne/<br>carne | DNA/<br>DNA | carne/<br>carne | DNA/<br>DNA | carne/<br>carne | DNA/<br>DNA | carne/<br>carne |
| 24,59       | 22,82           | 23,90       | 23,15           | 22,13       | 20,21           | 21,67       | 20,26           | 22,74       | 17,95           |
| 24,63       | 22,76           | 24,09       | 23,14           | 22,21       | 20,18           | 21,70       | 20,21           | 22,73       | 17,86           |
| 24,49       | 22,76           | 23,99       | 23,14           | 22,16       | 20,14           | 21,78       | 20,13           | 21,27       | 18,34           |
| 24,38       | 22,66           | 24,03       | 23,16           | 22,16       | 20,12           | 21,69       | 20,12           | 21,32       | 18,51           |
| 24,44       | 22,66           | 24,04       | 23,15           | 22,16       | 20,41           | 21,71       | 20,19           | 21,70       | 18,64           |
| 24,37       | 22,68           | 23,99       | 23,20           | 22,14       | 20,19           | 21,78       | 20,19           | 22,90       | 18,65           |
| 24,37       | 22,77           | 24,02       | 23,18           | 22,16       | 20,17           | 21,90       | 20,18           | 22,70       | 18,76           |
| 24,46       | 23,01           | 24,04       | 23,27           | 22,13       | 20,24           | 21,69       | 20,27           | 23,10       | 18,78           |
| 26,90       | 23,02           | 17,50       | 22,99           | 20,10       | 20,05           | 20,10       | 20,33           | 23,00       | 18,53           |
| 26,80       | 23,11           | 17,70       | 23,01           | 20,10       | 20,03           | 20,20       | 20,36           | 22,80       | 18,65           |
| 27,10       | 23,06           | 18,50       | 23,03           | 20,20       | 19,97           | 20,10       | 20,31           | 22,90       | 18,62           |
| 27,20       | 23,05           | 17,10       | 22,93           | 20,30       | 20,00           | 20,10       | 20,27           | 22,50       | 18,59           |
| 26,40       | 22,89           | 18,00       | 23,62           | 20,30       | 19,39           | 20,20       | 19,76           | 22,70       | 18,72           |
| 26,60       | 22,86           | 17,80       | 23,61           | 19,30       | 19,35           | 20,20       | 19,74           |             | 18,76           |
| 27,00       | 22,80           | 18,90       | 23,59           | 19,20       | 19,30           | 20,10       | 19,74           |             | 18,76           |
| 25,10       | 22,94           | 17,90       | 23,70           | 19,30       | 19,39           | 20,00       | 19,83           |             | 18,70           |
| 25,20       | 22,91           | 19,00       | 23,38           | 19,50       | 20,21           | 20,10       | 19,93           |             | 18,48           |
|             | 22,72           |             | 23,39           |             | 20,29           |             | 19,86           |             | 18,49           |
|             | 22,60           |             | 23,41           |             | 20,28           |             | 19,86           |             | 18,44           |
|             | 22,53           |             | 23,41           |             | 20,24           |             | 19,84           |             | 18,48           |
|             | 22,63           |             | 23,51           |             | 20,24           |             | 20,04           |             | 18,85           |
|             | 22,64           |             | 23,56           |             | 20,12           |             | 20,09           |             | 18,88           |
|             | 22,63           |             | 23,52           |             | 20,21           |             | 19,94           |             | 18,83           |
|             | 22,71           |             | 23,43           |             | 20,16           |             | 19,93           |             | 18,78           |
|             | 22,98           |             | 23,35           |             | 19,68           |             | 19,58           |             | 20,94           |
|             | 22,32           |             | 23,41           |             | 19,53           |             | 19,46           |             | 20,75           |
|             | 22,30           |             | 23,36           |             | 19,66           |             | 19,40           |             | 20,82           |
|             | 22,63           |             | 23,51           |             | 19,68           |             | 19,45           |             | 20,86           |
|             | 24,16           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,47           |
|             | 24,15           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,33           |
|             | 24,27           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,41           |
|             | 24,19           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,32           |
|             | 23,91           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,35           |
|             | 23,98           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,49           |
|             | 23,99           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,49           |
|             | 23,92           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,44           |
|             | 24,85           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,28           |
|             | 24,68           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,15           |
|             | 24,71           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,14           |
|             | 24,79           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,22           |
|             | 23,55           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,40           |
|             | 23,54           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,41           |
|             | 23,61           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,46           |
|             | 23,58           |             |                 |             |                 |             |                 |             | 20,44           |

Tab. 5: Ct analisi campioni 1% di DNA target diluito in DNA di altra specie e 1% carne target miscelata a 99% di carne non target.

Dalla tabella si può osservare come ci sia una certa differenza tra la serie di repliche DNA/DNA e carne/carne; per tutte le specie in esame si osserva come il Ct ottenuto dalle diluizioni DNA/DNA sia superiore di almeno 1 ciclo del Ct ottenuto dall'omogeneizzazione delle carni.

Tramite l'analisi della varianza, che permette di confrontare due gruppi di dati confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi, si può osservare come tutti i valori assegnati alle specie siano di molto inferiori allo 0.05, il che sta a significare che vi è differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di dati (Tab. 6).

| <b>specie</b>   | <b>valore di significatività</b> |
|-----------------|----------------------------------|
| <b>bovino</b>   | 2,41922E-05                      |
| <b>suino</b>    | 2,01998E-10                      |
| <b>pollo</b>    | 3,70222E-19                      |
| <b>tacchino</b> | 2,01707E-18                      |
| <b>cavallo</b>  | 5,84332E-06                      |

Tab. 6: significatività delle differenze tra i dati della Tab. 5

## 4.2 Analisi del DNA nei campioni commerciali

I campioni pervenuti presso l'Istituto Zooprofilattico erano di diversa natura e matrice alimentare. In totale sono stati analizzati 195 campioni.

L'analisi è stata condotta tramite l'estrazione di DNA con il kit promega, e successiva quantificazione con Sybr-Green in Real-Time PCR.

In base alle richieste pervenute si sono utilizzati diverse coppie di primers.

I campioni sono stati raggruppati secondo la loro natura:

- kebab;
- pasta ripiena;
- preparato per pasta ripiena;
- insaccati e salumi;
- altri campioni di diversa natura;
- pet-food.

I risultati sono mostrati nelle seguenti tabelle dove la colonna materiale riporta le tipologie del campione e le colonne successive riportano le specie per cui il campione è stato analizzato.

| materiale              | bovino | maiale | pollo | tacchino | cavallo | carne | gatto | pecora | capra | bufalo | coniglio |
|------------------------|--------|--------|-------|----------|---------|-------|-------|--------|-------|--------|----------|
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         | n     |       | n      | n     |        | n        |
| kebab pollo            | n      | n      | p     | n        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo            | n      | n      | p     | n        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         | n     |       | n      | n     |        | n        |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         | n     |       | n      | n     |        | n        |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         | n     |       | n      | n     |        | n        |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         | n     |       | n      | n     |        | n        |
| kebab pollo/tacchino   |        | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   |        | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   |        | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   |        | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   |        | n      | p     | p        | n       |       |       |        |       |        |          |
| kebab tacchin/agnello  | n      | n      | n     | p        |         |       |       | p      |       |        |          |
| kebab vitello/tacchino | n      | p      | n     | n        |         | n     | n     | n      | n     | n      | n        |
| kebab vitello/tacchino | n      | p      | n     | n        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab vitello/tacchino | n      | p      | n     | n        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab vitello/tacchino | n      | n      | n     | p        |         | n     |       | n      | n     |        | n        |
| kebab vitello/tacchino | p      | n      |       | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab vitello/tacchino |        | n      |       |          | n       |       |       |        |       |        |          |
| kebab vitello/tacchino | p      | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |
| kebab pollo/tacchino   | n      | n      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |          |

Tab. 7: Kebab

| materiale                | bovino | maiale | pollo | cavallo |
|--------------------------|--------|--------|-------|---------|
| tortellini carne         |        |        |       | n       |
| tortellini carne         |        |        |       | n       |
| tortellini carne         |        |        |       | n       |
| tortellini carne         |        |        |       | n       |
| tortellini carne         |        |        |       | n       |
| tortellini carne         |        |        |       | n       |
| tortellini carne         |        |        |       | n       |
| tortellini carne         |        |        |       | n       |
| tortelloni carne         |        |        |       | n       |
| tortelloni carne         |        |        |       | n       |
| tortelloni carne         |        |        |       | n       |
| tortelloni prosc. Crudo  |        |        |       | n       |
| tortelloni speck         |        |        |       | n       |
| tortelloni speck         |        |        |       | n       |
| cappelletti carne bianca |        |        |       | n       |
| cappelletti carne bianca |        |        |       | n       |
| cappelletti carne bianca |        |        |       | n       |
| cappelletti prosc. Crudo |        |        |       | n       |
| cappelletti prosc. Crudo |        |        |       | n       |



|                       |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|
| carne suino           |   |   |   |   | n |   |
| carne suino           |   |   |   |   | n |   |
| carne suino           |   |   |   |   | n |   |
| carne suino           |   |   |   |   | n |   |
| macinato bovino       | p | n |   |   | n |   |
| macinato bovino       | p | n |   |   | n |   |
| macinato bovino       | p | n |   |   | n |   |
| macinato bovino       |   |   |   |   | n |   |
| macinato bovino       | p | n |   |   |   |   |
| macinato bovino       | p | n |   |   | n |   |
| macinato bovino       | p | n |   |   | n |   |
| macinato bovino-suino | p | p | n |   |   |   |
| macinato suino        |   |   |   |   | n |   |
| misto bovino/suino    |   |   |   |   | n |   |
| misto bovino/tacchino | p | n |   | p |   |   |
| misto pollo           |   | n | p | n |   |   |
| carne macinata        | n | p | n | n | n |   |
| sugo bolognese        | p | n |   |   |   |   |
| macinato suino        | n | p |   |   |   |   |
| macinato suino        | n | p | n | n | n | n |
| macinato suino        |   |   |   |   | n |   |

Tab. 9: preparato per pasta ripiena

| <b>materiale</b>      | <b>bovino</b> | <b>maiale</b> | <b>pollo</b> | <b>tacchino</b> | <b>cavallo</b> | <b>pecora</b> | <b>capra</b> | <b>coniglio</b> |
|-----------------------|---------------|---------------|--------------|-----------------|----------------|---------------|--------------|-----------------|
| pancetta suina        | n             | p             |              |                 | n              |               |              |                 |
| pancetta suina        | n             | p             |              |                 | n              |               |              |                 |
| pasta salame          |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| pollo in pezzi        | n             | n             | p            | n               |                |               |              |                 |
| pollo in pezzi        | n             | n             | p            |                 | n              |               |              |                 |
| polpette bovino       | p             | n             |              |                 | n              |               |              |                 |
| prosc. Crudo          |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| prosc. Crudo          |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| salame                |               | p             |              |                 | n              |               |              |                 |
| salame                | n             | p             |              |                 |                |               |              |                 |
| salame                | n             | p             |              |                 | n              |               |              |                 |
| salame di tacchino    |               |               |              | p               |                |               |              |                 |
| salame milano         | n             | p             |              |                 | n              |               |              |                 |
| salame piccante       |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| salame suino c/aglio  |               | p             |              |                 |                |               |              |                 |
| salame suino classico |               | p             |              |                 |                |               |              |                 |
| salame ungherese      | n             | p             |              |                 | n              |               |              |                 |
| soppressa             | n             | p             |              |                 |                |               |              |                 |
| speck                 |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| speck                 |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| impasto salame        | n             | p             |              |                 | n              |               |              |                 |
| mortadella            | n             | p             | n            | n               | n              | n             | n            | n               |
| mortadella            | n             | p             |              |                 |                |               |              |                 |
| mortadella            |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| mortadella            |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| mortadella            |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| mortadella            |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| mortadella            |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| mortadella            |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| mortadella            |               |               |              |                 | n              |               |              |                 |
| cotechino             | n             | p             |              |                 |                |               |              |                 |

Tab. 10: Insaccati e salumi

| materiale              | bovino | maiale | pollo | tacchino | cavallo | carne | gatto | pecora | capra | bufalo | cervo | coniglio |
|------------------------|--------|--------|-------|----------|---------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|----------|
| braciola cotta         | n      | p      |       |          | n       | n     | n     | n      |       |        |       |          |
| carcassa               |        | p      |       |          |         | n     |       | n      |       |        |       |          |
| carne                  | n      | n      | n     | n        | n       | n     | n     | n      | n     |        | n     | p        |
| carne agnello          |        |        |       |          |         |       |       | p      |       |        |       |          |
| carne cotta(coniglio?) | n      | n      | n     | n        | n       | n     | p     |        |       |        |       | n        |
| cordon bleu pollo      |        | p      | p     | p        |         |       |       |        |       |        |       |          |
| formaggio capra/mucca  | p      |        |       |          |         |       |       | n      | p     | n      |       |          |
| girelle pollo tacchino |        |        | p     | p        |         |       |       |        |       |        |       |          |
| mozzarella di bufala   | n      |        |       |          |         |       |       | n      | n     | p      |       |          |
| mozzarella di bufala   | n      |        |       |          |         |       |       | n      | n     | p      |       |          |
| muscolo cervo          | n      | n      |       |          | n       | n     |       |        |       |        | p     |          |

Tab. 11: Altre tipologie di matrici

n= negativo

p= positivo

= analisi non effettuata

Come si può osservare dalla tabelle vi sono 4 casi emblematici sulla totalità delle analisi.

Primo caso: riguarda l'analisi di un campione dichiarato kebab di vitello/tacchino. Il campione è stato testato per tutte le specie, a parte il cavallo, i risultati hanno mostrato la completa assenza delle specie pollo e tacchino, diversamente da quanto dichiarato dal produttore mentre presentava un 100% di carne di maiale (fig. 5);

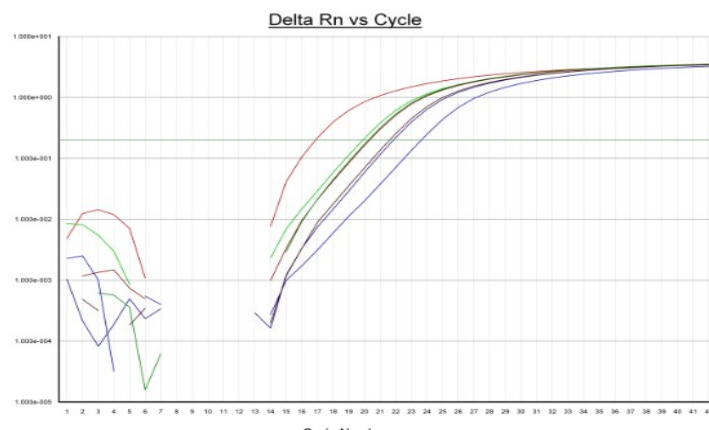


Fig. 5: Kebab contenente maiale



Secondo caso: riguarda un campione dichiarato kebab di vitello/tacchino. Il campione è stato testato per le specie bovino, tacchino, pollo, suino, cane, pecora, capra e coniglio ed in questo caso si è osservato l'assenza della specie bovino, diversamente da quanto dichiarato dal produttore, mentre si osserva la presenza del 100% della specie tacchino;

Terzo caso: riguarda una pasta ripiena, ravioli di carne. Il campione in esame è stato testato per la specie cavallo, nel periodo di allerta, e si è osservato la presenza della specie cavallo, superiore all'1%, anche in questo caso non dichiarato dal produttore.

Quarto caso: riguardava un campione di carne cotta, inizialmente si pensava fosse attribuibile alla specie coniglio (fig. 6); il campione è stato testato per diverse specie, tra cui la specie coniglio, ma si è osservato attribuibile alla specie gatto (fig. 7).

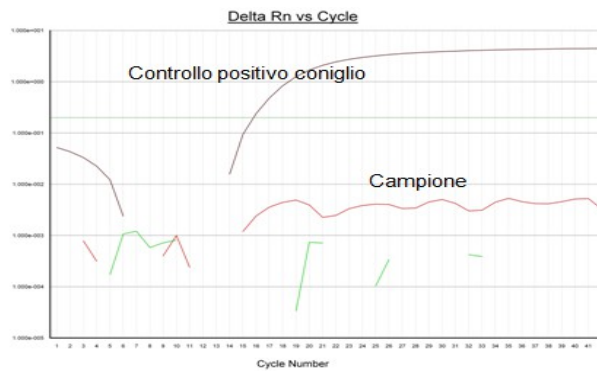


Fig. 6: Campione testato per la specie coniglio

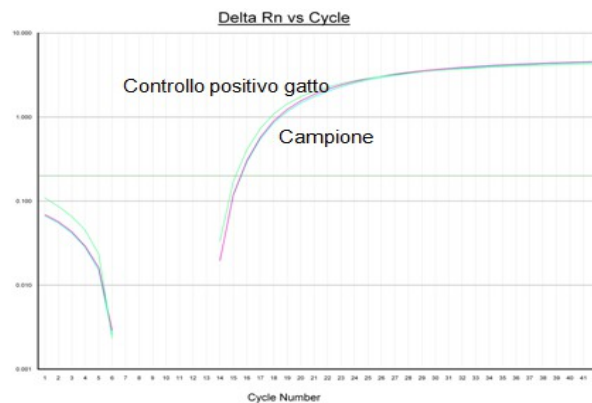


Fig. 7: Campione testato per la specie gatto

Per tutti gli altri campioni si riscontrano i dati relativi in accordo con quanto dichiarato dal produttore.

Un'ulteriore verifica è avvenuta osservando l'analisi delle curve di dissociazione e delle  $T_m$  (temperatura di melting) che ha consentito di identificare i segnali di amplificazione come corrispondenti agli amplificati ricercati poiché le  $T_m$  coincidono con quelle degli standard (fig.7-8-9).

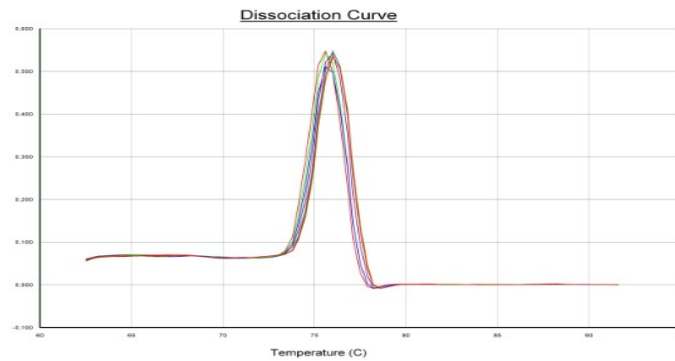


Fig. 7: curva di dissociazione kebab contenente maiale

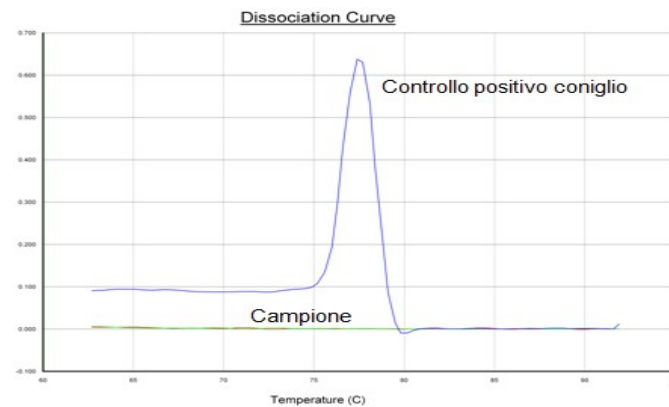


Fig. 8: Curva di dissociazione del campione testato per la specie coniglio

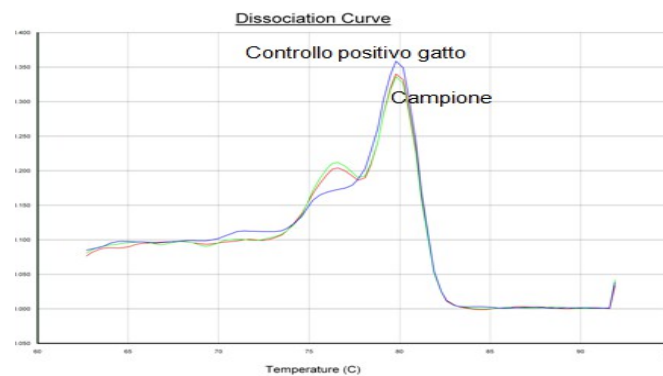


Fig. 9: Curva di dissociazione del campione testato per la specie gatto

Dati relativi al pet food:

| composizione        | bovino | maiale | pollo | tacchino | coniglio | pecora | cavallo | cervo | capra |
|---------------------|--------|--------|-------|----------|----------|--------|---------|-------|-------|
| cavallo/patate      | -      | -      | -     | -        | -        | ne     | +       | -     | ne    |
| coniglio/patate     | -      | -      | -     | -        | -        | ne     | -       | -     | ne    |
| cavallo/patate      | +      | +/-    | -     | -        | -        | ne     | -       | -     | ne    |
| cavallo/patate      | +/-    | +/-    | -     | -        | -        | ne     | +       | -     | ne    |
| cervo/patate        | +      | +/-    | -     | -        | -        | ne     | +       | -     | ne    |
| cervo/patate        | -      | -      | +     | +        | -        | ne     | -       | -     | ne    |
| cavallo/patate      | -      | -      | -     | -        | ne       | -      | +       | -     | -     |
| agnello/patate      | -      | -      | -     | -        | ne       | -      | -       | -     | -     |
| agnello/riso        | -      | +      | +/-   | -        | ne       | -      | -       | -     | -     |
| tacchino/riso       | +/-    | -      | +     | +/-      | ne       | -      | -       | -     | -     |
| cervo/patate        | -      | -      | -     | -        | ne       | -      | -       | -     | -     |
| agnello/riso        | +/-    | +      | +     | +/-      | ne       | +/-    | -       | -     | -     |
| agnello/riso/patate | -      | -      | -     | -        | ne       | +      | -       | -     | -     |
| cavallo/patate      | -      | -      | -     | -        | ne       | ne     | -       | ne    | -     |
| manzo               | +      | +/-    | -     | -        | ne       | ne     | -       | ne    | --    |
| manzo/riso          | -      | -      | -     | -        | -        | ne     | -       | ne    | ne    |
| cavallo/patate      | +      | +/-    | -     | -        | -        | ne     | -       | ne    | ne    |
| farina di coniglio  | -      | -      | +     | +        | +        | -      | -       | ne    | -     |
| farina di anatra    | -      | -      | +     | -        | -        | -      | -       | ne    | -     |
| farina di agnello   | -      | -      | -     | -        | -        | -      | -       | ne    | -     |
| farina di tonno     | -      | -      | +     | +        | -        | -      | -       | ne    | -     |

Tab. 12: Risultati relativi al Pet-Food.

+ = positività    +/- = campione dubbio

- = negatività    ne = non eseguito

Per quanto riguarda i dati relativi al pet-food si osservano risultati molto discordanti da quanto dichiarato dai produttori. Quasi tutti i campioni presi in esame hanno mostrato delle non conformità ed è stata verificata la presenza di altre specie alternative di quelle dichiarate (Tab. 12). I casi più eclatanti riguardano l'analisi delle farine, che si utilizzano per trasformarle in mangime, dove non si osserva minimamente la presenza della specie indicata e nemmeno la presenza di specie affini; per esempio nella farina di agnello è stata verificata l'assenza della specie indicata mentre è stata verificata la presenza delle specie pollo e tacchino; la farina di tonno, dove non è stata testata con primer per le specie ittiche, ha mostrato la presenza delle specie pollo e tacchino. Oppure la composizione cavallo/patate dove si nota la presenza della specie bovino e suino mentre il cavallo sembrerebbe assente, così come la composizione cervo/patate dove in questo caso è stata verificata la presenza della specie cervo ma si nota anche la presenza di bovino e suino.

## 5. DISCUSSIONE

La presenza di DNA in alimenti processati è stata dimostrata in numerose pubblicazioni (Meyer *et al.*, 1994; Hunt *et al.*, 1997; Hold *et al.*, 2001), anche se la quantità e la qualità del DNA presente possono essere condizionati dal processamento e dalla conservazione degli alimenti. Per esempio, alcuni studi, hanno dimostrato che il DNA viene completamente rimosso durante la produzione di zucchero (Klein *et al.* 1998), altri che la temperatura e il pH sono i fattori principali che influenzano la degradazione del DNA durante la produzione di pane, altri ancora che all'interno dell'olio di oliva è possibile ritrovare una quantità di DNA sufficiente per poter essere analizzato (Marmioli *et al.*, 2009).

Le tecniche biomolecolari sono ora largamente utilizzate per il controllo degli alimenti per il consumo umano e animale, ma tali tecniche possono anche presentare problemi e difficoltà specialmente nel caso di matrici eterogenee od alimenti sottoposti a trattamenti durante le fasi della lavorazione (Bottero, 2011). La perdita della struttura primaria del DNA è dovuta a diverse reazioni chimiche, tra cui l'ossidazione e l'idrolisi, che possono portare alla depurinazione e alla conseguente eliminazione delle basi azotate. A causa della risultante rottura del filamento di DNA, esso diventa più sensibile a degradazioni future e può perdere la sua attività biologica. Il trattamento a caldo e l'acidificazione sono processi comuni nell'industria alimentare: 85°C è la temperatura usata nei processi di pastorizzazione ad alta temperatura e breve tempo, e alimenti acidi (con pH di 4-4.5) sono il risultato delle fermentazioni. La temperatura rappresenta, tuttavia, un elemento trascurabile rispetto ad altri fattori, come la presenza di eventuali enzimi degradativi presenti negli ingredienti, o le condizioni chimiche a cui avviene il processamento, che possono accelerare o rallentare la degradazione del DNA. Il pH, ad esempio, risulta essere uno dei parametri più influenti.

In questa tesi i campioni analizzati mostrano una grande eterogeneità, ma la tecnica utilizzata ha sempre permesso di poter stabilire la presenza o meno della specie animale ricercata con una elevata sensibilità. Proprio questa elevata sensibilità, che rende visibile anche la presenza in tracce di specie non dichiarate

in etichetta, ha portato alla necessità di definire un valore di cut-off, stabilito all'1% di carne in carne dal EURL. La presenza oltre il cut-off di specie non dichiarate non indica nessun caso di frode ma solo la presenza di tracce. I risultati di questa tesi mostrano che la preparazione di campioni di riferimento con un contenuto di DNA della specie target all'1% è molto importante, infatti la comparazione dei campioni preparati con diluizioni di DNA /DNA e carne/carne danno risultati statisticamente significativi. Questo conferma ancora una volta l'importanza della matrice di partenza ai fini dell'estrazione di un DNA di qualità. Il DNA estratto da matrici alimentari è infatti molto degradato e presente in piccole quantità; la possibilità di poter identificare e amplificare mediante PCR tale DNA frammentato in modo corretto diminuisce drasticamente rispetto a DNA estratti da matrici non lavorate. La presenza di inibitori coestratti insieme al DNA è uno dei maggiori problemi nelle successive analisi del campione. Gli inibitori della PCR comprendono: composti organici e fenolici, polisaccaridi, glicogeno, grassi, collagene, metalli come ferro e cobalto (Wilson, 1997; Scholz, 1998), eventuali residui di cellule batteriche e qualsiasi DNA estraneo alla analisi. Gli inibitori possono: i) interferire con le metodiche di estrazione, ii) favorire la degradazione durante la purificazione degli acidi nucleici, iii) inibire le reazione di amplificazione (Wilson *et al.*, 1997).

La conferma della presenza di inibitori è chiaramente osservabile nel caso della valutazione del DNA del cavallo. È evidente come i cicli di uscita del DNA estratto dall'omogenizzato all'1% di carne/carne siano decisamente inferiori rispetto a quelli del DNA diluito in DNA; infatti, molto probabilmente, l'alta presenza di ferro nella carne di cavallo, inibitore del DNA, viene diluita dalla presenza di una diversa specie di carne molto più di quanto avvenga con una diluizione del DNA. Una volta determinato un valore cut-off può essere applicato a tutte le amplificazioni future affinché la reazione venga eseguita nelle stesse condizioni in cui si sia eseguito la determinazione del cut-off.

Complessivamente, per i campioni relativi all'alimentazione umana, i dati sono abbastanza corrispondenti a quanto dichiarato dai produttori in etichetta (2% non conformità). Dai risultati sono emersi quattro casi peculiari in cui non c'era corrispondenza con quanto dichiarato.

In particolare il gruppo di campioni di kebab ha mostrato le maggiori non conformità: 7%. In un campione di kebab non si è osservata la presenza delle specie indicate (pollo e tacchino) ma la presenza della specie suino. In questo caso oltre ad un frode in commercio, sanzionabile secondo l'art. 440-445, 455-459, si è di fronte ad un inganno rivolto al consumatore che va a ledere i propri principi morali e religiosi, infatti i prodotti certificati halal, come in questo caso, vietano l'utilizzo della carne di maiale (Farouk *et al.*, 2013; Gorni, 2008). Un altro campione di kebab ha mostrato invece l'assenza della specie dichiarata più costosa (vitello) e la completa costituzione della specie invece più economica (tacchino). In questo caso siamo di fronte ad una un frode in commercio.

Sull'onda dell'allerta comunitaria del febbraio 2013 in merito alla presenza di carne di cavallo non dichiarata in diversi tipi di alimenti e preparazioni a base di carne è stata rilevata una sola positività al cavallo in un caso di ravioli con ripieno di carne dichiarata di bovino nella totalità dei campioni presi in esame. Una incidenza molto bassa rispetto al resto d'Italia e soprattutto d'Europa.

In questo caso si è di fronte sia ad una frode in commercio sia ad una frode sanitaria, in quanto per frode sanitaria si intende una sostanza o cose da altri avvelenate, adulterate o contraffatte in modo pericoloso per la salute pubblica e ciò significa che il reato di frode si configura per il solo fatto di esporre, porre in commercio o distribuire, anche se, materialmente, non sono state cedute al consumatore. La presenza della specie cavallo, pregiata quanto il bovino, nelle misture delle paste ripiene può essere spiegata solo attraverso l'utilizzo di carni provenienti da cavalli non sottoposti a controlli sanitari, cavalli a cui possono essere stati somministrati delle sostanze illecite, quali dopanti od ormoni, le quali se consumate dalle persone potrebbero portare dei rischi per la salute pubblica essendo sostanze illecite.

Infine il campione di presunta carne di coniglio è stato testato con diverse coppie di primer per le specie bovino, suino, tacchino, pollo, cane, cavallo ma sorprendentemente è risultato positivo al 100% alla specie gatto. Questo dimostra l'estrema sensibilità e specificità della metodica di Real time PCR nell'analisi degli alimenti. La Real-Time misurazione "in tempo reale" del DNA amplificato, consente sia di ridurre il numero delle repliche necessarie alla determinazione di

ogni campione, sia di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, che rappresentano potenziali fonti di alterazione dei risultati, ed inoltre è dotata di elevata sensibilità (López-Calleja *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007;. Kesmen *et al.*, 2009;. Mininni *et al.*, 2009).

I campioni analizzati destinati all'alimentazione degli animali da affezione ha mostrato la più alta percentuale di non conformità con quanto dichiarato in etichetta dai produttori : 76%. Addirittura in campioni costituiti dalle farine animali utilizzate per la produzione di mangimi da parte di molte aziende non si è osservata la presenza della specie indicata e nemmeno di specie affini. Ad esempio nella farina di agnello è stata verificata l'assenza delle specie indicata mentre è stata verificata la presenza delle specie pollo e tacchino; ugualmente nella farina di tonno si è osservata presenza delle specie pollo e tacchino.

L'industria dell'alimentazione animale e del pet-food rappresenta un'estensione delle industrie di alimenti destinati al consumo umano. In particolare il settore pet-food apre sicuramente un mercato per gli scarti della macellazione, per i cereali considerati non adatti all'alimentazione umana e per altri prodotti di scarto che non potrebbero garantire profitti; per scarti si intende intestini, mammelle, esofagi e, probabilmente, le parti malate o cancerose degli animali macellati. Sulle etichette, queste parti vengono descritte come sottoprodotti che insieme alla farine ed ossa sono comuni ingredienti nei pet-food (What's Really In Pet Food report, from the Animal Protection Institute, API.). La regolamentazione riguardante il pet-food risponde al Regolamento comunitario sull'igiene dei mangimi (CE n. 183/2005). Attualmente non c'è una regolamentazione specifica per l'etichettatura di questi prodotti che comunque hanno un indotto altissimo per le aziende produttrici anche in seguito ai cambiamenti socio-culturali della società che hanno portato ad un grande cambiamento di ruolo degli animali nelle famiglie.

## 7. CONCLUSIONI

L'identificazione della composizione in specie animali di matrici alimentari complesse richiede l'utilizzo di tecniche ad elevata sensibilità i cui risultati non siano influenzati dai trattamenti termici che può aver subito l'alimento. Le biotecnologie a DNA rispondono positivamente a queste esigenze.

Grazie alla tecnica della Real-Time PCR è stato possibile confermare la conformità o meno delle indicazioni riportate dai produttori di alimenti riguardo le specie presenti nelle miscele di carni analizzate. Tuttavia la grande sensibilità della metodica ha portato alla necessità di utilizzare uno strumento per l'interpretazione dei dati individuato in un valore cut-off che è definito all'1% di carne della specie target in carne di specie diversa. In ogni reazione di PCR, quindi, sarà necessario utilizzare come controllo positivo un campione di DNA estratto da un preparato creato di carne in carne alla percentuale specifica. poiché si è dimostrato che le diluizioni di DNA in DNA non danno lo stesso risultato. Complessivamente i risultati di questa tesi mostrano che per i campioni relativi all'alimentazione umana, i dati sono piuttosto corrispondenti a quanto dichiarato dai produttori in etichetta. Fa eccezione il gruppo dei campioni di kebab dove sono state riscontrate non conformità, anche importanti. I prodotti certificati halal, destinati al mercato dei consumatori musulmani, ma non solo, stanno avendo un notevole incremento in termini di produzione e di volumi d'affari, per cui è imprescindibile che per il rilascio della certificazione halal il processo produttivo sia totalmente controllato dagli imam. Oltre alla produzione di alimenti halal è in forte espansione in Italia anche il resto della ristorazione etnica che, in quanto soggetta a possibili frodi di natura commerciale e non solo, dovrebbe essere soggetta a maggiori e specifici controlli.

Il gruppo di campioni in cui si è osservata una altissima percentuale di non conformità con quanto dichiarato in etichetta (76%) è quello dei campioni di pet-food. La regolamentazione riguardante il pet-food risponde solamente al Regolamento comunitario sull'igiene dei mangimi (CE n. 183/2005). Regolamento che non riguarda in alcun modo all'etichettatura e alla presenza di specie animali



presenti nei mangimi per gli animali da compagnia. Questi dati mostrano che sarebbe opportuna un'implementazione di tale regolamento in quanto il pet-food ha un indotto sempre più crescente di anno in anno per le aziende produttrici. Nonostante i risultati interessanti, tuttavia, la Real-time PCR presenta delle limitazioni in quanto l'uso dei coloranti intercalanti come il SYBR-Green consente di avere segnali di fluorescenza 200 volte superiore se legato a DNA a doppia elica, ma, qualora durante la reazione di PCR avvenisse un'amplificazione di DNA non specifica anch'essa viene rilevata. Il passaggio obbligato per lo sviluppo di questa tecnica è quindi la conversione dei test in SYBR-Green a test con l'utilizzo di sonde ad ibridazione che presenta un grosso vantaggio in quanto è necessaria un'ibridazione molto specifica tra il DNA target e la sonda per generare il segnale fluorescente. In questo caso le amplificazioni non specifiche come il mis-priming o gli artefatti come la dimerizzazione dei primers non generano segnale. Per contro il costo delle sonde ad ibridazione è molto più alto del SYBR-Green, ma c'è la possibilità dell'applicazione della tecnologia FAST.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Aida A.A., Che Man Y.B., Wong C.M., Raha A.R., Son R., (2005). Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Science* Jan: 47-52.
- Addendum to the EURL-AP protocol (Febbraio, 2013) : Cut-off to check the 1% level threshold of horse meat in another meat.
- Berry A.J., and Peter J.B., (1984). DNA probes for infectious disease. *Deagn. Med.:* 62-72.
- Bertasi B., et al., (2007). Messa a punto di metodiche su base PCR per l'identificazione di specie in alimenti a base di carne *Industrie alimentari-XLVI*.
- Bottero M.T., Dalmaso A., (2011). Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods. *The Veteterinary Journal* Oct: 34-8.
- Che Man Y.B., Aida A.A., Raha A.R., Son R., (2007). Identification of pork derivates in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for Halal verification. *Food Control* 18: 885-889.
- Diviacco S., Norio P., Zentilin L., Menzo S., Clementi M., Biamonti G. et al (1992). A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene*. 122: 3013-3020.
- Fajardo, V., González, I., López-Calleja, I., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., (2006). PCR–RFLP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *Journal of Agricultural Food Chemistry* 54: 1144–1150.

- Farouk M.M., (2013). Advances in the industrial production of halal and kosher red meat. *Meat Science*. Dec: 805-20.
- Ferrè F., Marchese A., Pezzoli P., Griffin S., Buxton E., and Boyer V. (1994). Quantitative PCR: an overview. In: Mullis K.B., Ferrè F., and Gibbs R.A., editors. *The polymerase chain reaction*. Basel, Berlin: Birkhauser boston: 67-88.
- Gorni C., Losini I., Pancaldi M., Piffanelli P., Mariani P., (2008). Identificazione di specie animali in matrici alimentari complesse mediante PCR qualitativa e quantitativa. *Industrie alimentari-XLVII*.
- Hemmer W., (1997). Foods derived from genetically modified organism and detection methods. *BATS- Report 2/97*, BATS, Clarastrasse 13, 4058, Switzerland.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S. and Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10: 413-417.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R., (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-30.
- Holland P.M., Ambramson R.D., Watson R. and Gelfand D.H., (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaicus* DNA polymerase *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 7276-7280.
- ISO/IEC 17025:2005 è una norma che esprime i "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura".

- ISO 22005 (edizione luglio 2007). La norma fornisce i principi e specifica i requisiti di base per progettare ed attuare un sistema di rintracciabilità agroalimentare. La norma può essere applicata da un'organizzazione che opera in qualsiasi fase della filiera agroalimentare.
- Jonker K.M., et al., (2008). Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Additives and Contaminants*.
- Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., Yetim, H., (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science* 82: 444–449.
- Kremer P., Rencova E., (2001). Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. *Journal of Food Protection* 64: 117–119.
- Lahiff S., Glennon M., O'Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M., Shilton N., (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Molecular and Cellular Probes* 15: 27–35.
- Lasagna E., Sarti F., Sorbolini S., De Martino F., Panella F., (2005). Estrazione di DNA genomico da differenti fonti tissutali animali per la costituzione di una banca del genoma della razza chianina. *4th World Italian Beef Cattle Congress, Italy*.
- Lee L.G., Connel C.R., and Bloch W., (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* 21: 3761-3766.
- López-Andreo M., Lugo L., Garrido-Pertierra A., Prieto M.I., Puyet A., (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* Apr: 73-82.

- López-Andreo M., Garrido-Pertierra A., Puyet A., (2006), Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *Journal Agriculture Food Chemistry*. Oct: 7973-8.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., (2007a). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by realtime PCR. *Food Control* 18: 1466–1473.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., (2007b). Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. *International Dairy Journal* 17: 729–736.
- Mahony J.B., Luinstra K.E., Waner J., MacNab G., Hobranzka H., Gregson D., Sellors J.W., and Chernesky M.A., (1994). 101 Interlaboratory agreement study of double set of PCR plasmid primers for detection of *Chlamydia trachomatis* in a variety of genitourinary specimens. *J.Clin. Microbiol.* 32: 87-91.
- Meyer R., Candrian U., Lüthy J., (1994). Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*: May-Jun: 617-22.
- Meyer R., Höfelein C., Lüthy J., Candrian U., (1995). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*: Nov-Dec: 1542-51.
- Meyer R., Chardonnens F., Hübner P., Lüthy J., (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z Lebensm Unters Forsch.* Oct: 339-44.

- Meyer R., U. Candrian U., (1996). PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 29: 1–9.
- Myers M.J., Friedman S.L, Farrell D.E., D.A. Dove-Pettit, Bucker M.F., Kelly S., Madzo S., Campbell W., Wang R.F., Daine D., (2001). Validation of a polymerase chain reaction method for the detection of rendered bovine-derived materials in feedstuffs. *Journal Food Prot* 64: 564–566.
- Mininni A.N., Pellizzari C., Cardazzo B., Carraro L., Balzan S., Novelli E., (2009). Evaluation of real-time PCR assays for detection and quantification of fraudulent addition of bovine milk to caprine and ovine milk for cheese manufacture. *International Dairy Journal* 19: 617–623.
- Momcilovic D., Rasooly A., (2000). Detection and analysis of animal materials in food and feed. *Journal Food Protein* 63: 1602–1609
- Mullis K.B., Ferrè F., and Gibbs R.A., (1998). “The Polymerase Chain reaction. Birkauser- Vergal, Basel.
- Murugaiah C., Noor ZM., Mastakim M., Bilung L.M., Selamat J., Radu S., (2009). Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA. *Meat Science*: Sep: 57-61.
- Nebbia G., "Aspetti storici del problema del controllo della qualità delle merci nel mondo antico e nel Medioevo" (1962). Quaderni di Merceologia: 327– 380.
- Orlando C., Pinzani P., and Pazzagli M., (1998). Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem Lab Med.* 36: 255-269.

- Raccomandazione 2013/99/UE del 19 febbraio; la Commissione europea ha chiesto agli Stati membri di adottare un *“Piano coordinato di controllo volto a stabilire la prevalenza di pratiche fraudolente nella commercializzazione di determinati prodotti alimentari.”*
- Regolamento (CE) n. 1760/2000 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 luglio 2000, che istituisce un sistema di identificazione e di registrazione dei bovini e relativo all'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carni bovine, e che abroga il regolamento (CE) n. 820/97 del Consiglio.
- Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
- Regolamento (CE) N. 183/2005 del parlamento europeo e del consiglio del 12 gennaio 2005 che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi.
- Regolamento (CE) n. 213/2001 della Commissione, del 9 gennaio 2001, che stabilisce modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 1255/1999 per quanto riguarda i metodi per le analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari
- Rogberg-Muñoz A., Posik D.M., Rípoli M.V., Falomir Lockhart A.H., Peral-García P., Giovambattista G., (2013). Recent patents for detecting the species of origin in animal feedstuff, and raw and processed meat products. *Recent Patents on Food Nutrition Agriculture*. Apr 5: 3-8.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. Erlich H.A., (1998). Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 487-482.

- Semeraro Marisa (2011). Frodi alimentari: aspetti tecnici e giuridici.
- Scholz M., (1998). A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extract is determined as human collagen type I. *Analytical Biochemistry*, 259: 283–286.
- Soares S., Amaral J.S., Oliveira M.B., Mafra I., (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science* May: 115-20.
- What's Really In Pet Food report, from the Animal Protection Institute, API,) [www.api4animals.org](http://www.api4animals.org)
- Wilson I.G., (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environment Microbiology*, 63: 3741–375
- Wolcott M.J., (1992). Advances in nucleic – acid basic detection methods. *Clin. Microbiol.* 5: 370-386.
- Woolfe M., Primrose S., (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 22, 222–226.
- Zhang, C.L., Fowler, M.R., Scott, N.W., Lawson, G., Slater, A., (2007). A TaqMan realtime PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control* 18: 1149–1158.
- Ulca P., Balta H., Çağın I., Senyuva H.Z., (2013). Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. *Meat Science*. Jul: 280-4.
- Unione Nazionale Consumatori, (2013), Agropirateria e frode alimentare, origine dell'inganno e tutela dei consumatori.