

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”

FACOLTÀ DI AGRARIA



**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE PRODUZIONI AGRO-ALIMENTARI
XXVIII CICLO 2013-2016**

***STUDIO E VALIDAZIONE DI METODI DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE
DI SPECIE IN MATRICI ALIMENTARI***

TUTOR

CH. MO PROF. *GIANCARLO BARBIERI*

CANDIDATO

DOTT.SSA *BIANCA CECERE*

INDICE

1. INTRODUZIONE: Le frodi alimentari

1.1	Made in Italy!	6
1.2	Cenni storici	6
1.3	Le frodi alimentari: definizioni	7
1.3.1	Le frodi commerciali	7
1.3.2	Le frodi sanitarie	7
1.4	Le frodi alimentari più comuni e diffuse	9
1.5	Frodi alimentari in Italia: aspetti tecnici e giuridici	11
1.6	Dal produttore al consumatore: food-safety e food-authenticity	12
1.7	Applicazioni della “tracciabilità molecolare”	13
1.8	La PCR applicata all’identificazione di specie	13
1.9	Il Cyt B	14
1.10	Validazione di metodi di prova biomolecolari per l’identificazione di DNA in alimenti.	15

2. SCOPO DELLA TESI 16

3. MATERIALE E METODI

3.1	Campioni	17
3.2	Estrazione del DNA genomico	20
3.3	Polymerase Chain Reaction	20
3.4	Profilo termico	21
3.5	Elettroforesi del prodotto di PCR	21

4. RISULTATI	
4.1 Primers	22
4.2 Allestimento PCR	22
4.3 Estrazione dei campioni	22
4.4 Interpretazione dei risultati	24
4.5 Alcune analisi rappresentative	24
5. DISCUSSIONE	28
6. CONCLUSIONE E PROSPETTIVE	30
7. BIBLIOGRAFIA	31
8. RINGRAZIAMENTI	34

RIASSUNTO

Nelle società contemporanee le scelte dei consumatori in fatto di alimenti non riflettono semplicemente la necessità di soddisfare le proprie esigenze nutritive, ma anche il loro stile di vita, il loro credo religioso (ad es. l'assenza di carne di maiale per ebrei e musulmani) o i problemi di salute che li affliggono (ad es. l'assenza di arachidi, glutine o lattosio per le persone con allergie particolari) (Musto, 2006).

La non corrispondenza tra quanto dichiarato e quanto effettivamente presente nel prodotto acquistato rappresenta una frode alimentare.

La corretta identificazione di specie rappresenta un punto cruciale nel controllo della qualità alimentare al fine di evitare la frode.

Oggi l'analisi del gene codificante il citocromo b è stata universalmente adottata per identificare specie animali.

Il metodo utilizzato e validato nell'identificazione di specie in alimenti in questo lavoro è una PCR-Multiplex, cioè una PCR end-point costituita da più set di primers in un'unica mix per produrre ampliconi. Questi sono di varie dimensioni e specifici per diverse sequenze di DNA target.

Questa metodica consente di amplificare contemporaneamente diversi segmenti dello stesso gene d'interesse utilizzando coppie d'ineschi differenti. Prendendo di mira molte specie in un solo esperimento di PCR, le informazioni necessarie possono essere acquisite da un singolo test che altrimenti richiederebbe l'uso di più reagenti e più tempo per l'esecuzione. Sono state oggetto di studio le seguenti matrici a base di carne: hamburger, salsicce (fresche ed essiccate), kebab, polpette e wurstel.

Il DNA è stato isolato mediante l'uso del kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen), secondo le linee guida date dalla casa produttrice. Il DNA è stato quantificato mediante lettura biofotometrica (Eppendorf BioPhotometer). L'estratto è stato successivamente sottoposto ad amplificazione mediante l'impiego di specifici primers. I prodotti PCR sono stati analizzati con il QIAxcel (Qiagen): un sistema avanzato, completamente automatizzato, di elettroforesi capillare.

Sono stati analizzati 51 campioni: tutti, tranne due, sono risultati conformi all'etichetta.

Nel primo campione non conforme (un hamburger) dichiarato solo bovino, sono state ritrovate tracce di suino. Nel secondo campione non conforme (un wurstel) dichiarato bovino e suino, sono state ritrovate tracce di pollo.

Uno sviluppo futuro di tali prove sarà la messa a punto di una PCR Multiplex Real Time, in modo da testare velocemente i campioni sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo.

ABSTRACT

In contemporary societies, consumers' choices in terms of food does not simply reflect the need to meet their nutritional needs, but also their lifestyle, their religious beliefs (for ex. the lack of pork for Jews and Muslims) or health problems that afflict them (for ex. the absence of peanuts, gluten or lactose for people with allergies) (Musto, 2006).

The mismatch between what is said and what is actually present in the product purchased is a food fraud.

The correct identification of species represents a crucial point in the control of food quality in order to avoid fraud.

Today, the analysis of the gene encoding the cytochrome b has been universally adopted to identify animal species.

The method used and validated in the identification of species in foods in this work is a PCR-Multiplex, that is an end-point PCR built of multiple sets of primers in a single mix to produce amplicons. These are of various sizes and specific for different target DNA sequences.

This method allows you to simultaneously amplify different segments of the same gene of interest using the different primers pairs. By targeting many species in a single PCR experiment, the necessary information can be acquired by a single test that would otherwise require the use of more reagents and more time for the execution.

Have been the subject of study the following meat matrices: burgers, sausages (fresh and dried), kebabs, meatballs and wurstel.

The DNA was isolated by the use of the QIAamp DNA Mini kit (Qiagen), according to the guidelines given by the manufacturer. DNA was quantified by reading biofotometrica (Eppendorf BioPhotometer). The extract was then subjected to amplification by the use of specific primers. The PCR products were analyzed with QIAxcel (Qiagen): an advanced, fully automated capillary electrophoresis.

Were analyzed 51 samples: all, but two, were found to conform to the label.

In the first sample does not comply (a hamburger) said only cattle, pork traces were found. In the second sample does not comply (a wurstel) said cattle and pig, chicken traces were found.

One future development of such tests will be the development of a Multiplex Real Time PCR, in order to quickly test the samples both from a qualitative and quantitative point of view.

“Esiste una relazione fra la nostra vita e quella della nostra madre terra.. e l’uomo dovrebbe essere il custode dell’ambiente”

(Papa Francesco)

1. LE FRODI ALIMENTARI

1.1 Made in Italy!

Il Made in Italy è inteso non solamente come produzione localizzata nel nostro Paese, ma anche come percezione del prodotto nel suo insieme, sia esso enogastronomico che manifatturiero, sintesi perfetta fra destrezza, materie prime eccellenti e soprattutto tradizioni. Se volessimo contabilizzare in modo meramente economico il brand Made in Italy si evidenzerebbe come esso è il terzo marchio più noto al mondo dopo Coca-Cola e Visa. Non c'è crisi che tenga, il prodotto italiano, così come ci riportano le stime, nelle esportazioni è sempre e comunque in crescita. Il valore del made in Italy è tale che, le organizzazioni criminali hanno intravisto un ottimo strumento per “fare soldi” facilmente. Si stima infatti che il falso made in Italy nel food vale circa 60 miliardi di euro, circa la metà del fatturato totale del prodotto dell'industria alimentare italiana che si stima si aggiri sui 132 miliardi di euro.

Le contraffazioni e le illegalità nel mercato estero sono praticamente il doppio rispetto ai 34,3 miliardi di export. L'Italian Sounding, ovvero la commercializzazione di prodotti che portano nomi di marchi che “suonano italiani” ma che non sono affatto prodotti in Italia, è negli ultimi anni cresciuto, di pari passo con le esportazioni, triplicando però il valore del +180%. E' inquietante verificare come solo un prodotto alimentare su 8 di quelli venduti come Made in Italy è realmente italiano!(Rapporto Frodi Alimentari 2015, Fareambiente)

1.2 Cenni storici

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. (Nebbia G., 1962). L'orefice che preparò la corona per Gerone di Siracusa (270 a.C.) cercò di ingannare il suo cliente mescolando all'oro metalli meno pregiati e ci volle Archimede per svelare la frode, con un ingegnoso sistema che gli permise di inventare il metodo per la misura del peso specifico dei corpi. Plinio, nella sua “Storia naturale”, spiega bene come i commercianti adulterassero gli alimenti, le droghe, le spezie e soprattutto quelli che arrivavano a Roma da paesi lontani, e indica vari metodi per svelare le frodi (I secolo d.C.). Delle frodi si trovano denunce anche nella Bibbia.

Il vero cammino trionfale delle frodi alimentari comincia con la rivoluzione industriale: il proletariato poteva essere sfruttato non solo in fabbrica, con bassi salari e condizioni disumane di lavoro, ma anche nella bottega. Agli inizi del 1800 le frodi alimentari erano così diffuse da indurre il chimico Fredrick Accum a scrivere un celebre libretto sull'adulterazione dei cibi, col sottotitolo: *"La morte nella pentola"*, con riferimento alla intossicazione alimentare di Eliseo e dei suoi compagni, raccontata nella Bibbia nel quarto Libro dei Re. Il libro di Accum, pubblicato nel 1820 a Londra, fu il primo di una lunga serie di scritti di denuncia delle frodi alimentari in seguito ai quali il Parlamento inglese nominò, nel 1834, una prima commissione d'inchiesta; poiché le frodi continuavano, altre due commissioni d'inchiesta, nel 1855 e nel 1856 svelarono al pubblico quante porcherie arrivavano sulla tavola degli inglesi. L'indagine fu sostenuta da una vivace campagna di stampa; il settimanale satirico inglese Punch, durante i lavori della Commissione parlamentare, pubblicò il 4 agosto 1855 una celebre vignetta che mostra una bambina nel negozio di un droghiere. *"Signore, dice la bambina, la mamma la prega di darmi un etto di tè della migliore qualità, per uccidere i topi, e mezzo etto di cioccolata per sterminare gli scarafaggi"*. Lo scandalo portò all'approvazione, nel 1860, della prima legge inglese contro le adulterazioni degli alimenti.

Quello delle frodi alimentari è un capitolo poco esplorato della storia contemporanea; in Italia se ne parlò negli anni cinquanta del Novecento, dopo varie denunce giornalistiche sulle frodi nel campo dell'olio, delle paste alimentari, del pane, e anche in quella occasione furono emanate nuove leggi più attente alla difesa della salute e dei diritti dei consumatori e anzi da allora, cinquant'anni fa, nacque in Italia un movimento di difesa dei consumatori, proprio come era nato in America cento anni fa. In tutti i casi citati il merito delle denunce e delle riforme è stato sempre della stampa e di giornalisti coraggiosi.

1.3 Le frodi alimentari: definizioni

La frode alimentare o sofisticazione alimentare è definita come l'intervento fraudolento (quindi non conforme alle norme vigenti) perpetrato ai danni del consumatore di prodotti alimentari, arrecandogli danni di natura economica e igienico-sanitaria.

Gli illeciti, più semplicemente definite frodi, sono molteplici, ma si possono suddividere in due grandi categorie: quelle commerciali, in cui possiamo far rientrare la modifica non conforme del segno identificativo di un prodotto, e quelle sanitarie, che modificando la composizione, possono creare adulterazione, sofisticazione sostituzione.

1.3.1 Le frodi commerciali

Le frodi commerciali si verificano quando nel corso di un'attività commerciale avviene la “*consegna all'acquirente di 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 C.P.], 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, infatti le frodi commerciali ledono i diritti patrimoniali e contrattuali del consumatore. 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,*”. Sono considerate frodi in commercio la contraffazione e la falsificazione.

Per **Contraffazione** (Codice Penale art. 440,442) si intende l'azione fraudolenta che consiste essenzialmente nel conferire al prodotto alimentare una denominazione diversa da quella reale, solitamente di un prodotto più pregiato, ovvero di produrre 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 (D.O.C) o anche vendere per formaggio di pecora un formaggio fatto con latte bovino. Le **Falsificazioni** consistono nel sostituire un prodotto con un altro, come nel classico esempio della margarina al posto del burro.

1.3.2 Le frodi sanitarie

Le frodi sanitarie possono essere identificate come tali 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 (art. 32 Costituzione-Tutela della 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*” (dal Codice penale). Ciò significa che il reato di frode si configura anche per il solo fatto di esporre, porre in commercio o distribuire, anche se, materialmente, non sono state cedute al consumatore. Le frodi sanitarie vengono generalmente suddivise in: sofisticazione, adulterazione ed alterazione.

Per **Sofisticazione** (Codice penale art.515/art.5 L. 283/62) si intende l'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. L'**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. Infine l'**Alterazione** (legge.283/62 art.5) che è l' 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.

1.4 Le frodi alimentari più comuni e 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.); l'utilizzo di aromi per nascondere il gusto di vini scadenti, trucioli di legno per dare il sapore di *barrique*, lo zucchero per elevare il grado alcolico.

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 e 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. 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 di 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. Per esempio: 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 (H₂O₂) 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 (C₆H₆N₆) 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.

Per quanto riguarda le uova si dichiara il falso sulla data di scadenza, di deposizione o di imballaggio. L'Istituto centrale repressione frodi ha riscontrato, infatti, casi di postdatazione delle confezioni, ma anche di mancato confezionamento delle uova entro i termini previsti: condotte che consentono di fatto di commercializzare uova di qualche giorno come appena deposte.

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.

1.5 Frodi alimentari in Italia: aspetti tecnici e giuridici

L'attività di prevenzione e repressione delle frodi agroalimentari in Italia è demandata a numerosi organi di controllo ufficiale, variamente articolati e diversificati nelle finalità che l'azione di vigilanza si prefigge.

I principali organismi incaricati dei controlli ufficiali su prodotti agroalimentari, mezzi di produzione, attività di produzione, commercio, somministrazione di alimenti e bevande, nonché in materia di igiene, profilassi e vigilanza veterinaria sugli animali destinati all'alimentazione umana, fanno capo sostanzialmente al Ministero delle Politiche Agricole, Alimentarie Forestali, Ministero della Salute, Ministero dell'Economia e delle Finanze, Comuni, Regioni e Province autonome.

Oltre alle Amministrazioni pubbliche partecipano attraverso reparti specializzati, Arma dei Carabinieri, il Corpo forestale dello Stato e la Guardia di Finanza. Tra i principali organismi con compiti di controllo in campo agroalimentare e di contrasto alle frodi rientra l'Agenzia delle Dogane.

Il complesso di norme esistenti in tema di repressione della frode alimentare è quanto mai variegato ed il sistema sanzionatorio attuale si articola su diversi livelli. Particolare importanza assumono le norme del Codice Penale dedicate ai "delitti di comune pericolo mediante frode" che, concepite per la tutela degli interessi dei consumatori, garantiscono l'affidamento di questi nella genuinità, integrità, purezza dei prodotti alimentari. Si tratta di un complesso di disposizioni che punisce le condotte di alterazione e di contraffazione di sostanze alimentari idonee a produrre rischi per la collettività.

In particolare, l'Art. 439 del Codice Penale punisce l'avvelenamento di acque o di sostanze destinate all'alimentazione con la reclusione non inferiore a quindici anni. Se dal fatto deriva la morte di una o più persone, la pena è quella dell'ergastolo. Con la reclusione da tre a dieci anni è punita, invece, secondo quanto previsto dall'Art. 440 del Codice Penale, l'adulterazione, ovvero la contraffazione di sostanze alimentari se pericolose per la salute pubblica.

Soggiace alle stesse pene chi detiene per il commercio, pone in commercio, o distribuisce per il consumo acque, sostanze o cose che sono state da altri avvelenate, corrotte, adulterate o contraffatte in modo pericoloso alla salute pubblica. Si tenga presente che la condotta vietata si configura anche per il solo fatto di esporre sostanze alimentari pericolose.

Il Codice Penale punisce, poi, le condotte idonee a ledere i diritti contrattuali e patrimoniali del consumatore. In questa prospettiva si collocano le disposizioni sulla frode nell'esercizio del commercio e sulla vendita di sostanze alimentari non genuine, come genuine di cui agli Artt. 515 e 516 del Codice Penale. La pena prevista per la frode in commercio è la reclusione fino a due anni ovvero la multa fino a euro 2.065,00.

Da ultimo, la vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine è punita con la reclusione fino a sei mesi ovvero con la multa fino a euro 1.032,00. La giurisprudenza ha precisato che per sostanza alimentare non genuina deve intendersi quella che non contiene le sostanze o i quantitativi previsti ovvero quella che contiene additivi non consentiti (Cass. pen., 18 ottobre 1995, n. 11090, nel caso di specie si è ravvisata la vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine nella condotta di chi pone in vendita salsiccia fresca di carne suina che poi risulta contenere carne bovina).

La Legge n. 283 che assoggetta "a vigilanza per la tutela della salute la produzione e il commercio delle sostanze destinate all'alimentazione", prevede ispezioni e prelievi di campioni per accertarne la rispondenza ai requisiti fissati dalla legge da affidarsi a soggetti che, scelti tra il personale sanitario o tecnico, sono qualificati ufficiali o agenti di polizia giudiziaria (Artt. 1, 3, e 4).

1.6 Dal produttore al consumatore: food-safety e food- authenticy

Ad oggi la trasparenza rispetto l'origine dei prodotti alimentari, ed in particolare dei prodotti animali, è ormai considerata da parte dei consumatori una componente importante della qualità e della sicurezza.

Il controllo dell'origine dei prodotti e dell'identità degli animali lungo i diversi passaggi della filiera, dall'allevatore alla vendita al dettaglio, cioè la tracciabilità, sono il mezzo, ma anche la risorsa, con cui il consumatore tutela la propria salute ed i propri interessi.

La tracciabilità è anche un importante elemento per la competitività e la valorizzazione dei prodotti nei mercati, sia a livello locale, che a livello nazionale e internazionale; inoltre è a 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. La tracciabilità, oltre a fornire un sistema di controllo per l'igiene e la sicurezza degli alimenti, permette di difendere 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. Permette di essere più competitivi in chiave di export; tale certificazione, per molti consumatori stranieri (vedi mercato ebraico e musulmano) è garanzia di qualità, salubrità e sicurezza alimentare. 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.

Il primo caso di tracciabilità della filiera nacque per far fronte alla difficile situazione venutasi a creare a seguito della crisi BSE. Il Parlamento Europeo, proprio in quella occasione, emanò 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.

Da allora in poi prende vita la "tracciabilità molecolare", derivante dall'identificazione di specie animali e vegetali. Con il tempo diventerà lo strumento indispensabile per smascherare eventuali frodi perpetrate ai danni del consumatore, e per la certificazione di autenticità dei prodotti di origine controllata.

1.7 Applicazioni della “tracciabilità molecolare”

- ✓ identificazione delle specie animali nei prodotti a base di carne;
- ✓ identificazione di specie ittiche (DNA-barcoding);
- ✓ 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;
- ✓ la tracciabilità di tossine batteriche o contaminanti fungini (le micotossine);
- ✓ la tracciabilità degli OGM (Organismi Geneticamente Modificati).

1.8 La PCR applicata all'identificazione di specie

Negli ultimi anni la biologia molecolare ha avuto un ruolo cruciale nell'identificazione di specie negli alimenti di origine animale a base di carne, pesce e latte (Lasagna, 2005). La PCR (Polymerase Chain Reaction) è la metodica maggiormente utilizzata a tal fine, vista anche la sua velocità di esecuzione, i costi contenuti e la possibilità di analizzare grosse quantità di campioni contemporaneamente. Bisogna ricordare, però, che è un test qualitativo e che la sua estrema sensibilità può dare errori di interpretazione dei risultati. Infatti 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).

Critica, in una PCR, è la scelta dei primers. I primers con una lunghezza tra le 18 e le 25 bp assicurano una maggiore specificità di appaiamento (Berry A.J & Peter J.B., 1984). Primers troppo corti, infatti, sono poco specifici, avendo alte probabilità di trovare diverse zone di complementarietà nel genoma. Il contenuto di G+C deve essere più o meno del 60% rispetto alle A+T. E' bene evitare sequenze ripetute e/o complementari (Hemmer W., 1997) e la possibilità che formino strutture secondarie. Altri criteri da tenere sotto controllo sono: la concentrazione e la qualità del DNA stampo (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), la concentrazione dei primers, dei sali, il numero di cicli, la 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 (Mahony J.B. *et al.*, 1994). 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).

1.9 Il Cyt B

Il DNA indagabile, estratto dai campioni in esame, può essere nucleare o mitocondriale.

Il DNA nucleare è diploide e di derivazione paterna e materna; quello mitocondriale è di derivazione unicamente materna, per questo aploide e non ricombinante, ma con un elevato tasso di mutazione.

Il DNA mitocondriale viene spesso preferito a quello nucleare perché ha minori dimensioni, vi è la presenza di più copie di mt-DNA nella cellula, per numerose specie vi è già una conoscenza avanzata delle sequenze di mt-DNA ed infine sono assenti gli introni (grandi frammenti non codificanti).

Di tutti i geni presenti nella sequenza del DNA mitocondriale ai fini del riconoscimento di specie si studiano:

- ✓ Il gene del citocromo b (cyt b)
- ✓ Il gene della subunità ribosomiale 16S
- ✓ Il gene della subunità ribosomiale 12S

Il gene del citocromo b (cyt b) risulta idoneo all'identificazione di specie di differenti organismi mediante lo studio delle sue sequenze nucleotidiche grazie alle seguenti peculiarità:

- ✓ Presenza di regioni altamente conservate alternate a regioni variabili
- ✓ Notevoli variazioni inter e intraspecifiche nella sequenza nucleotidica
- ✓ Minore variazione intraspecifica
- ✓ Maggiore variazione interspecifica

In questo lavoro la PCR è stata impiegata per identificare sei matrici carnee: bovina, suina, avicola, ovina, caprina, equina, che sono le principali utilizzate nei prodotti trasformati. Sono stati miscelati 7 primers in rapporti adeguati: un solo primer forward disegnato su una sequenza altamente conservata del gene mitocondriale che codifica per il citocromo b e 6 primer reverse disegnati su sequenze specie-specifiche dello stesso gene (Anderson *et al.*, 1982; Irwin *et al.*, 1991; Desjardins and Morais, 1990). I primers sono stati progettati in modo da dare 6 frammenti di lunghezza diversa (Matsunaga *et al.*, 1999), caratteristici di ciascuna specie (vd. Figura 1.1)

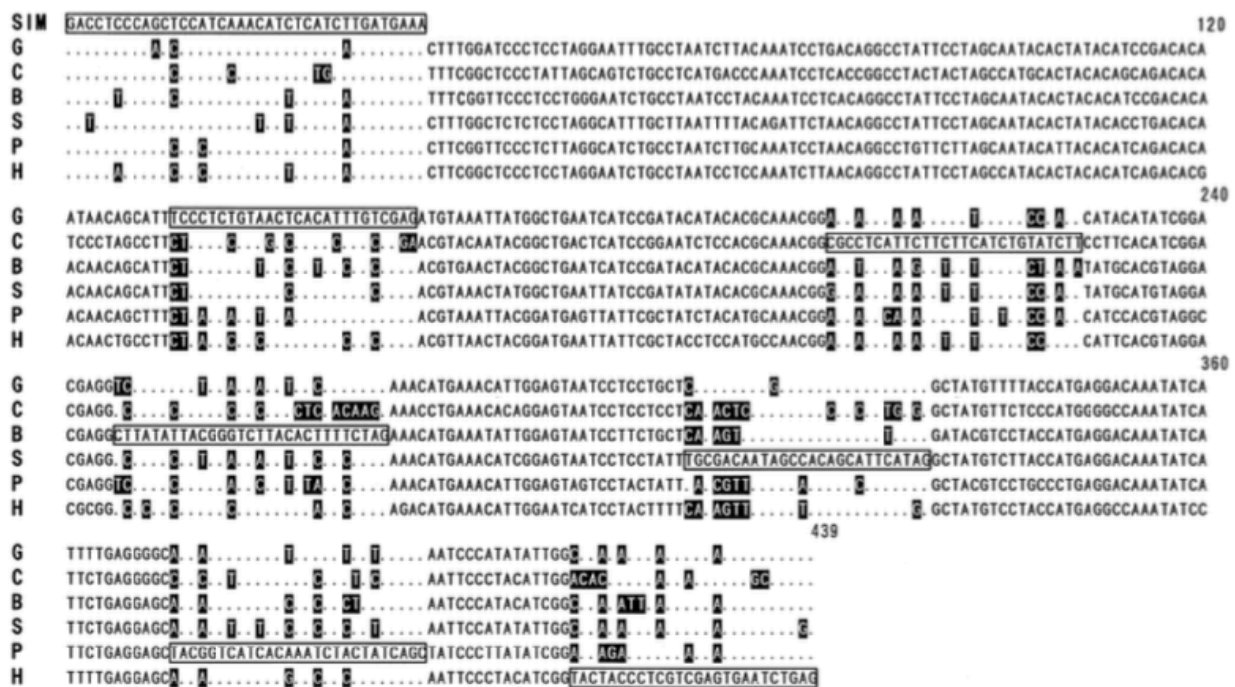


Fig. 1.1: sequenza nucleotidica dei primers e regioni target sul gene del cyt b (Matsunaga *et al.*, 1999)

1.10 Validazione di metodi di prova biomolecolari per l'identificazione di DNA in alimenti.

La validazione di un metodo di prova biomolecolare per l'individuazione, l'identificazione e la quantificazione di specifiche sequenze del DNA in alimenti è un aspetto focale per il laboratorio interessato all'accreditamento da parte di ACCREDIA, ovvero l'Ente Italiano di Accreditamento, nonché l'unico organismo nazionale autorizzato dallo Stato a svolgere tale attività. Il laboratorio in questione (in questo caso l'U.O. di Analisi del Genoma dell'IZSM) sarà così, una volta "accreditato" il metodo, organo garante di: imparzialità e indipendenza. Tale validazione viene effettuata secondo le Linee Guida definite dal Codex Alimentarius (CAC/GL 74-2010) e il protocollo per la progettazione, l'esecuzione e l'interpretazione degli studi sulle prestazioni di un metodo emesso dalla IUPAC nel 1995. E' molto importante validare un metodo in quanto durante un'analisi vi sono molteplici variabili che possono inficiare l'esito del risultato. Il metodo utilizzato e validato nell'identificazione di specie in alimenti in questione è una PCR-Multiplex, cioè una PCR end-point costituita da più set di primers in un'unica mix per produrre ampliconi.

Un metodo basato sull'identificazione del DNA mediante PCR deve consentire di individuare e identificare specifiche sequenze del DNA. Esso deve includere:

- ✓ una descrizione delle sequenze oligonucleotidiche delle coppie di primers utilizzate che amplificano univocamente le sequenze di DNA target;
- ✓ indicazione della lunghezza dei prodotti di amplificazione. La lunghezza dei prodotti di amplificazione potrebbe influenzare le prestazioni della PCR, pertanto la scelta di amplificati di piccole dimensioni aumenta la possibilità di ottenere segnali positivi, soprattutto nell'analisi di prodotti alimentari sottoposti a processi di trasformazione;
- ✓ una descrizione delle sequenze oligonucleotidiche dei primers che amplificano una sequenza specie specifica di DNA che dovrebbe essere presente in una matrice alimentare convenzionale, indipendentemente dalla presenza di uno specifico analita, allo scopo di distinguere un risultato negativo da un errore durante il processo di estrazione o di amplificazione e di quantificare la quantità relativa di dna target relativa al dna specie specifico;

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi (o anche Metodo di Prova) è la ricerca e l'identificazione di DNA animale: bovino, suino, equino, ovino, caprino e avicolo (pollo/tacchino) mediante multiplex PCR al fine di verificare la corrispondenza con quanto dichiarato in etichetta.

Questa procedura si applica a campioni di tessuto animale, alimenti crudi e cotti di origine animale, sia non trasformati che trasformati.

Un alimento non trasformato è un prodotto alimentare non sottoposto a trattamento. Sono compresi in questa definizione i prodotti che siano stati divisi, separati, sezionati, affettati, disossati, tritati, scuoiati, frantumati, tagliati, puliti, rifilati, decorticati, macinati, refrigerati, congelati, surgelati o scongelati (REG. CE 852/2004).

Un alimento trasformato è quel prodotto alimentare ottenuto dalla trasformazione (cioè sottoposto ad un trattamento) di prodotti non trasformati. I prodotti trasformati possono contenere ingredienti necessari alla loro lavorazione o per conferire loro caratteristiche specifiche (REG. CE 852/2004).

Per trattamento si intende qualsiasi azione che provoca una modificazione sostanziale del prodotto iniziale, comprendente il trattamento termico, affumicatura, salagione, stagionatura, essiccazione, marinatura, estrazione, estrusione o una combinazione di questi procedimenti (Art.2, paragrafo 1, lettera m, REG. 852/2004).

3. Materiali e metodi

3.1 Campioni

I campioni raccolti dalle autorità competenti (nella maggior parte dei casi i prelievi sono stati fatti da parte dei Dipartimenti di Prevenzione Veterinaria delle varie ASL) ed inviati all'IZSM (sede di Portici) provengono soprattutto dalla piccola distribuzione. All'atto del ricevimento, il campione è stato sottoposto a prova oppure conservato a -20°C fino alla sua lavorazione. I campioni analizzati in questo studio sono stati riportati in tabella 3.1.

Tabella 3.1: prodotti analizzati e loro composizione. Negli ingredienti, i nomi comuni delle specie animali sono sottolineati

Prodotto (denominazione in etichetta)	Ingredienti dichiarati in etichetta
Polpette di bovino	Carne di <u>bovino</u> (80%), pan grattato, acqua, cipolle, sale iodato, spezie, olio di palma, destrosio, amido, senape, uovo
Kebab di tacchino e vitello allo spiedo speziato e surgelato	Carne di <u>tacchino</u> (55%), carne di vitello (37%), latte, acqua potabile, proteine della soia, sale da cucina, spezie (contiene sedano), stabilizzatori e451, e450, e262, e331, esaltatore di sapidità e621, zucchero, sciroppo di glucosio, amido modificato e1422, aromi
Kebab di pollo allo spiedo, speziato e surgelato	Carne di <u>pollo</u> (92%), latte, acqua potabile, proteine della soia, sale da cucina, spezie, stabilizzatori e451, e450, e262, e331, esaltatore di sapidità e621, zucchero, sciroppo di glucosio, amido modificato e1422, estratto di carne in granuli, aromi
Salsiccia dolce stagionata	Carne di <u>suino</u> , sale, zuccheri (destrosio, saccarosio), aromi e spezie Antiossidante e301, conservante e242, e250
Hamburger di bovino, pecora, suino	<u>Manzo</u> , <u>suino</u> , <u>agnello</u> , grano macinato (farina di grano, sale, lievito), cipolla, sale, pepe nero, origano
Carne fresca congelata	Macinato di <u>suino</u>
Carne fresca congelata	Macinato di <u>bovino</u>
Hamburger crudo surgelato di bovino	Carne di <u>manzo</u> (98%), sale per alimenti, spezie (contiene senape)
Carne fresca di bovino	Macinato di <u>bovino</u>
Salame di suino	Carne di <u>suino</u> , formaggio, e160, e251, e252, lardo, sale, spezie, destrosio, saccarosio, glutammato monosodico difosfato, acido ascorbico, brodo granulare, nitrito di sodio, affumicatura
Carne fresca refrigerata di bovino	Macinato di <u>bovino</u>
Hamburger di carne bovina	Carne di <u>manzo</u> (98%), sale per alimenti, spezie (contiene senape)
Salame di maiale	Carne di <u>suino</u> (73%), acqua, emulsionante di cotenna, lardo, proteina vegetale di soia, sale, amido, stabilizzatori, aroma (glutammato monosodico), antiossidanti (ascorbato di sodio, citrato di sodio, acido ascorbico, ascorbato di sodio), condimenti naturali, conservanti (acetato di sodio, nitrito di sodio), aroma, coloranti naturali, budello non commestibile
Carne fresca refrigerata di bovino	Macinato di <u>bovino</u>
Salsiccia di suino con aglio	Carne di <u>suino</u> (57%), acqua, carne di testa di maiale, grasso di maiale, fecola di patata, sale, proteina della soia, glucosio, trifosforati, aglio, cellulosa, maltodestrine, aromi, olio eterico, spezie, proteine della soia idrolizzate, ascorbato di sodio, isoascorbato di sodio, glutammato di sodio, estratto di vino rosso, cetrato di sodio, azotato di sodio

Salame affumicato di suino e bovino	Carne di <u>suino</u> , carne di <u>manzo</u> , emulsione di cotenna, acqua, proteina vegetale di soia, sale, correttore di acidità, antiossidanti (ascorbato di sodio, acetato di sodio), acido ascorbico, stabilizzatori (sodio difosfato), estratto di spezie naturali, coloranti naturali (carminio), conservanti (acetato di sodio, nitrito di sodio)
Salsiccia stagionata di suino	Carne di <u>suino</u> , sale, destrosio, saccarosio, antiossidanti e300, e252, e250
Soppressata di suino	Carne di <u>suino</u> , sale, destrosio, saccarosio, antiossidanti e300, e252, e250
Kebab di pollo e tacchino	Carne di <u>pollo</u> (62%), carne di <u>tacchino</u> (25%), acqua potabile, latte magro, yogurth, sale da cucina, proteine di soia, spezie (contiene sedano e senape), stabilizzanti E450, E451, E331, E460, E262, esaltatore di sapidità E621, amido modificato, sciroppo di glucosio, zucchero, destrosio, brodo in granuli (fruttosio, grasso di palma, estratto di lievito, aroma, acidificante E330), condimento
Hamburger di pollo e tacchino	Carne di <u>tacchino</u> tritata (41%), carne di <u>pollo</u> (23%), acqua, pangrattato (farina di frumento, acqua, sale, lievito), grasso di pollo e tacchino, cipolla, sale iodato (sale, iodato di potassio), spezie e piante aromatiche (contiene sedano), olio di palma, destrosio, amido di frumento, uovo. Panino al sesamo: farina di frumento, acqua, zucchero, olio di colza, lievito, sale, sesamo 1,3%, lievito madre di frumento. Formaggio Gouda: latte, sale, caglio.
Carne fresca	Fettine di <u>vitello</u>
Hamburger	Macinato di <u>bovino</u>
Salsiccia fresca	Carne di <u>maiale</u>
Salame di suino	Carne e lardo di <u>suino</u> , sale, lattosio, latte in polvere, destrina, erbe fini, proteine del latte, proteine di soia, destrosio, spezie, acidificante E575, stabilizzante E451, antiossidante E301, esaltatore di sapidità E621, aroma di fumo, conservante E252, colorante E120. Superficie trattata con conservante E235
Kebab di vitello e tacchino	Carne di <u>vitello</u> , carne di <u>tacchino</u> , spezie, sale, glutine, sedano, zucchero, esaltatore di sapidità E621, proteine animali, addensante, farina di soia, farina di ceci, proteine del latte, lattosio, farina di guar, gelatina.
Carne di pollo	Carne di <u>pollo</u> (64%), farina (frumento, mais, malto di frumento), acqua, dadi di pancetta (6,6%), carne di <u>maiale</u> , sale per alimenti, antiossidante E301, aromi, sciroppo essiccato di glucosio, stabilizzanti E450, E451, conservante E250, fumo, olio di colza, amido di frumento modificato, aromi, aromatizzante di affumicatura, lievito, destrosio, esaltatori di sapidità (E621, E627, E631), spezie, amido di riso, olio di semi di girasole, regolatori di acidità E331, zucchero, estratto di lievito, proteina vegetale idrolizzata, (soia, mais)
Salame di suino	Trito di <u>suino</u>
Salame di suino	Trito di <u>suino</u>
Wurstel di suino	Carne di <u>maiale</u> (77%), acqua, lardo bovino, fecola di patate, sale, proteina vegetale di soia, spezie, stabilizzanti (difosfati, trifosfati), spezie e estratti di spezie, zuccheri, aromi, esaltatori di sapidità (glutammato monosodico), antiossidante (acido ascorbico), colorante (carminio), conservante (nitrito di sodio)
Salsiccia stagionata di suino	Carne di <u>suino</u> , sale, destrosio, saccarosio, antiossidanti e300, e252, e250

Salsiccia fresca di suino	Carne di <u>suino</u> , sale, destrosio, semi di finocchio, aromi naturali, spezie, antiossidante E301, conservanti E252
Carne fresca	Macinato di <u>bovino</u>
Carne fresca	Fettine di <u>bovino</u>
Salsiccia fresca di suino	Carne di <u>suino</u> , vino bianco
Carne fresca	Arista di <u>suino</u>
Carne fresca	Fettine di <u>vitello</u>
Carne fresca	Coppa di <u>suino</u>
Carne fresca	Macinato di <u>bovino</u>
Hamburger	Macinato di <u>bovino</u>
Salsiccia stagionata di suino	Carne di <u>suino</u> , sale, lattosio, ptoteine del latte, vino bianco, peperoncino, antiossidanti e300, e252, e250
Carne fresca	Carne di <u>suino</u>
Carne fresca	Macinato di <u>bovino</u>
Carne fresca	Macinato di <u>bovino</u> e <u>suino</u>
Carne fresca	Macinato di <u>bovino</u>
Sanguinaccio	Sangue di <u>suino</u> , acqua, coagulante E509,
Kebab di pollo	Carne di <u>pollo</u> , sale, latte in polvere, spezie naturali, stabilizzatori, polifosfati di potassio e sodio, citrato di sodio, proteine e fibre alimentari
Polpettine di carne	Carne di <u>suino</u> e <u>manzo</u> , acqua, pan grattato (farina, acqua, sale, lievito), cipolle, patate, sale iodato, olio di palma, amido, fibre di patate, destrosio, spezie, senape, uovo
Polpettine di carne	Carne di <u>pollo</u> e <u>tacchino</u> , acqua, pan grattato (farina, acqua, sale, lievito), grasso di pollo e tacchino, cipolle, patate, sale iodato, olio di palma, destrosio, amido, uovo
Polpettine di carne	Carne di <u>suino</u> (80%), acqua, pan grattato (farina, acqua, sale, lievito), cipolle, patate, sale iodato, olio di palma, amido, fibre di patate, destrosio, spezie, senape, uovo
Hamburger crudo surgelato	Carne di <u>manzo</u> (98%), sale, spezie (contiene senape), aromi, estratti di spezie
Salsiccia stagionata	Carne di <u>suino</u> , sale, spezie, aromi, zucchero, fruttosio, destrosio, antiossidante E300, conservante E252

3.2 Estrazione del DNA genomico

Questa operazione è stata eseguita nei locali opportunamente designati alla fase di estrazione. L'isolamento del DNA è stato eseguito mediante il kit QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). Si collocano in ciascuna provetta 25 mg di campione e si aggiungono 180 µl di buffer ATL e 20 µl di Proteinase K. Una volta miscelato, il campione viene messo in agitazione a 56°C per 1h. Si aggiungono poi 200 µl di buffer AL e si mette ad incubare la miscela a 70°C per 10 minuti. Al lisato si aggiungono 200 µl di 96% Etanolo. Il lisato è trasferito in una colonnina QIAamp Mini Spin Columns. Dopo centrifugazione per 1 minuto a 8000 rpm, si aggiungono alla colonna 500 µl di Buffer AW1. Dopo centrifugazione per 1 minuto a 8000 rpm, si aggiungono 500 µl di Buffer AW2. Dopo centrifugazione per 3 minuti a 13000 rpm, ciascuna colonnina va centrifugata nuovamente per 1 minuto a 13000 rpm. Il DNA viene eluito con 200 µl del buffer di eluizione (AE), incubato a temperatura ambiente per circa 5 minuti e centrifugato per 1 minuto a 8000 rpm. Il DNA viene quantificato mediante lettura ad un fotometro (Eppendorf BioPhotometer).

3.3 Polymerase Chain Reaction

L'Allestimento della mix di reazione è eseguita sotto cappa a flusso laminare nelle zone del laboratorio dedicate all'allestimento delle mix di PCR.

Sono stati impiegati i seguenti controlli positivi (Biotools)

- DNA ovino
- DNA equino
- DNA caprino
- DNA avicolo
- DNA suino
- DNA bovino
-

La mix di reazione è costituita dai reagenti indicati nella Tabella 3.2

Tabella 3.2: miscela di reazione per multiplex PCR

Reagente e concentrazione	Marca	Volume per campione	Concentrazione Primers per campione
H ₂ O	Qiagen	13,5 µl	
DNA stampo			
Primer forward 10µM	Life Technologies	3,5 µl	35 pmoli
Primer revers 10µM	Life Technologies	0,5 µl	5 pmoli
HotStartTaq master Mix2x	Qiagen	25 µl	
Volume finale		45 µl	

L'estratto è successivamente sottoposto ad amplificazione mediante l'impiego di specifici primers (Life Technologies) riportati in Tabella 3.3.

Tabella 3.3: sequenze dei primers utilizzati per la PCR, che amplificano porzioni di CytB (Matsunaga *et al.*, 1999)

Primer	Sequenza
IdF (Forward)	5'GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGAT GAAA 3'
Capra R (Reverse)	5'CTCGACAAATGTGAGTTACAGAGGGA 3'
Pollo R (Reverse)	5' AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG 3'
Bovino R (Reverse)	5' CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG 3'
Ovino R (Reverse)	5' CTATGAATGCTGTGGCTATTGTGCGCA 3'
Suino R (Reverse)	5' GCTGATAGTAGATTTGTGATGACCGTA 3'
Cavallo R (Reverse)	5' CTCAGATTCCTCGACGAGGGTAGTA 3'

3.4 Profilo termico

Le PCR sono state condotte nel termociclatore Geneamp 2700 (Applied Biosystems). Il profilo termico è riportato in tabella 3.4.

Tabella 3.4: profilo termico

	Temperatura	Tempo
1 ciclo		
Attivazione Taq	95 °C	15'
35 cicli		
Denaturazione	94 °C	30''
Annealing	54 °C	30''
Polimerizzazione	72 °C	1'
1 ciclo		
Estensione finale	72 °C	10'
1 ciclo	4 °C	∞

3.5 Elettroforesi del prodotto di PCR

La presenza dei prodotti di amplificazione è stata analizzata tramite corsa dei campioni nell'analizzatore automatico di DNA/RNA Qiaxcel (Qiagen).

In alternativa, è possibile analizzare gli amplificati mediante elettroforesi su gel precasting con corsa elettroforetica ad un voltaggio costante di 80 V per 50 minuti. Al termine del processo di elettroforesi viene esaminato il gel al transilluminatore a raggi UV. La lettura dei risultati, viene effettuata verificando la presenza/assenza di bande elettroforetiche, le cui dimensioni vengono determinate per confronto con le bande presenti nel marcatore di peso molecolare (100 bp, Invitrogen).

4. Risultati

4.1 Primers

In questo lavoro la PCR è stata impiegata per identificare sei matrici carnee: bovina, suina, avicola, ovina, caprina, equina, che sono le principali utilizzate nei prodotti trasformati. Sono stati miscelati 7 primers in rapporti adeguati: un solo primer forward disegnato su una sequenza altamente conservata del gene mitocondriale che codifica per il citocromo b e 6 primer reverse disegnati su sequenze specie-specifiche dello stesso gene (Anderson *et al.*, 1982; Irwin *et al.*, 1991; Desjardins and Morais, 1990). I primers sono stati progettati in modo da dare 6 frammenti di lunghezza diversa (Matsunaga *et al.*, 1999), caratteristici di ciascuna specie (vd. Tabella 4.2).

4.2 Allestimento PCR

La PCR è stata allestita provando a seguire i criteri applicati dal laboratorio per la maggior parte delle PCR di amplificazione, quindi utilizzando 25 µl di HotStarTaq MM (Qiagen), 18 µl di acqua, 1 µl 10 µM del primer forward, 1 µl 10 µM del primer reverse. Adattando la miscela ai 6 reverse e rispettando il rapporto F/R 1:1, la PCR è stata così modificata: 25 µl di HotStarTaq MM (Qiagen), 14 µl di acqua, 3 µl 10 µM del primer forward, 0,5 µl 10 µM di ogni primer reverse. La ricerca del profilo termico giusto è stato un passaggio critico del lavoro dato che il primer forward si disallinea per circa 3-5 basi su 38 con le 6 specie. Poiché ogni 1% di mismatch in una doppia elica del DNA corrisponde ad una riduzione della T_m di 1-1,5 °C (Matsunaga *et al.*, 1999), i disallineamenti con il primer forward ridurrebbero la T_m di circa 10-15 °C. Per questo il primer forward è stato disegnato più lungo dei reverse, i quali sono di 26-29 nucleotidi. In sostanza, essendo i rapporti di mismatch più del 15%, la T_m si abbassa di circa 15 °C, in modo tale che ci sia appaiamento solo con le sequenze specie-specifiche.

Le prime prove sono state fatte utilizzando i controlli acquistati dalla Biotools, per poi accingersi ai campioni veri e propri.

4.3 Estrazione dei campioni

I campioni pervenuti presso l'Istituto Zooprofilattico sono indicati nella tabella 4.1. In totale sono stati analizzati 51 campioni.

Tabella 4.1: Tipologia e rispettive quantità di campioni analizzati

Matrice	Numero Campioni
Carne fresca	16
Salsiccia stagionata	12
Hamburger	8
Kebab	5
Salsiccia fresca	4
Polpette	4
Sanguinaccio	1
Wurstel	1

L'analisi è stata condotta tramite l'estrazione del DNA con il Kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

In alcuni campioni la preparazione dello stesso alla fase di estrazione richiede un po' più di attenzione. Ad esempio per l'estrazione di un campione di kebab è giusto fare un prelievo di matrice da ogni singolo pezzo che compone il prodotto; in pratica è utile "smontare" il campione in modo da essere certi di non aver tralasciato nulla. Nel caso di un campione di salsiccia è bene incidere il prodotto per la lunghezza e fare dei prelievi random, così come per i wurstel. Per gli hamburger e le polpette, essendo già dei prodotti macinati, basta procedere con il prelievo dell'aliquota da estrarre.

L'estrazione del DNA genomico di tutti i campioni in esame ha dato una buona resa. Il DNA è stato quantificato mediante lettura al fotometro (Eppendorf BioPhotometer). Negli episodi ove il campione si è presentato troppo

concentrato (su display si leggono una serie di “+++”) si è proceduto ad una ulteriore lettura del campione previa opportuna diluizione (es.: 1:10, oppure 1:20,...) con il Buffer di eluizione fornito dal kit di estrazione.

Tutti i campioni sono stati portati ad una concentrazione compresa tra i 20 e i 50 ng/μl prima di effettuare la PCR Multiplex.

4.4 Interpretazione dei risultati

Ogni campione è stato analizzato verificando la presenza/assenza di bande elettroforetiche attese, le cui dimensioni vengono determinate per confronto con le bande presenti nel marcatore di peso molecolare (100 bp, Invitrogen). Nella tabella 4.2 sono riportati i pesi molecolari delle bande amplificate mediante Multiplex PCR

Tabella 4.2: Valori di riferimento per le analisi PCR

Banda attesa (bp)	Specie presente
157	Capra
227	Pollo/Tacchino
274	Bovino
331	Pecora
398	Suino
439	Cavallo

4.5 Alcune analisi rappresentative

Di seguito sono riportati quattro esempi di analisi elettroforetiche rappresentative.

La Figura 4.1 rappresenta l'analisi di un campione di salsiccia che, secondo l'etichetta, conteneva esclusivamente carne di suino. L'analisi molecolare ha indicato la presenza del DNA di suino e l'assenza di quello delle altre specie animali in analisi.



Figura 4.1

Analisi della corsa elettroforetica al QIAxcel (elettroforesi automatizzata) di un campione di salsiccia stagionata amplificato con i primers specie-specifici.

1: Campione di salsiccia; 2: Replica del campione di salsiccia; 3: Controllo positivo caprino (157 bp); 4: Controllo positivo avicolo (pollo/tacchino) (227 bp); 5: Controllo positivo bovino (274 bp); 6: Controllo positivo ovino (331 bp); 7: Controllo positivo suino (398 bp); 8: Controllo positivo equino (439 bp); 9: Controllo negativo di processo; 10: Bianco estrazione; 11: Marker di peso molecolare (100bp). Ai margini della foto vi sono le bande del marker di peso molecolare calcolate dallo strumento.

La Figura 4.2 rappresenta l'analisi di un campione di Kebab in cui era dichiarata la presenza di pollo/tacchino. L'amplificazione del campione, esaminato in duplicato (Lane 2 e Lane 3), ha fornito un prodotto di dimensioni conformi al prodotto PCR del controllo positivo per le 2 specie avicole di interesse (tacchino e pollo), presente nella Lane 4. L'assenza di bande di dimensioni conformi agli altri controlli positivi, relativi alle altre specie in esame (dalla Lane 5 alla 9), ha indicato l'assenza di quantità rilevabili di DNA di altre specie animali oggetto dell'analisi (bovina, ovina, suina ed equina). L'assenza di prodotti di amplificazione per il controllo della PCR e il bianco di estrazione hanno indicato l'assenza di contaminazioni rilevabili.



Figura 4.2

Analisi della corsa elettroforetica al QIAxcel (elettroforesi automatizzata) di un campione di Kebab amplificato con i primer specie-specifici.

1: Marker di peso molecolare (100bp); 2: Campione di Kebab; 3: Replica del campione di Kebab; 4: Controllo positivo avicolo (pollo/tacchino) (227 bp); 5: Controllo positivo equino (439 bp); 6: Controllo positivo suino (398 bp); 7: Controllo positivo bovino (274 bp); 8: Controllo positivo ovino (331 bp); 9: Controllo positivo ovino (331 bp); 10: Controllo negativo di processo; 11: Bianco estrazione. Ai margini della foto vi sono le bande del marker di peso molecolare calcolate dallo strumento.

Questi due casi sono rappresentativi di analisi in cui si è verificata la conformità del campione all'etichettatura

La figura 4.3 riporta invece un esempio di non corrispondenza tra la dichiarazione in etichetta ed il risultato della analisi molecolari.

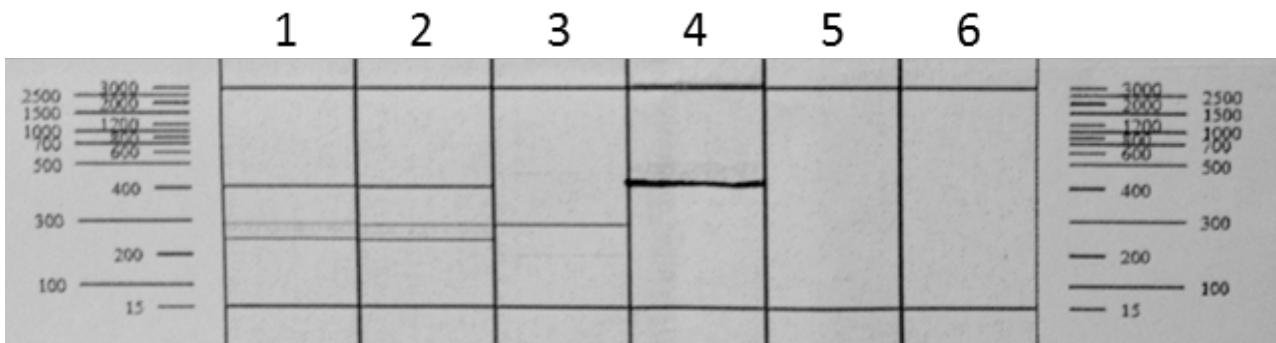


Figura 4.3

Analisi della corsa elettroforetica al QIAxcel (elettroforesi automatizzata) di un campione di wurstel amplificato con i primers specie-specifici.

1: Campione di wurstel; 2: Replica del campione di wurstel; 3: Controllo positivo bovino (274 bp); 4: Controllo positivo suino (398 bp); 5: Controllo negativo di processo; 6: Bianco estrazione. Ai margini della foto vi sono le bande del marker di peso molecolare calcolate dallo strumento.

Nel campione in esame (lane 1 e 2), un wurstel dichiarato bovino e suino, si sono amplificati i prodotti attesi, ovvero la banda di 274 e di 398 bp. E' però presente, in entrambe le repliche, un amplicone di circa 227 bp riconducibile alla presenza di matrice avicola (pollo/tacchino) nel campione di partenza, come si evince anche dal confronto con il controllo positivo avicolo (lane 3). In questo caso, l'intensità delle diverse bande amplificate nel campione alimentare in esame non risultano essere estremamente diverse. Volendo fornire anche un'interpretazione quantitativa, la banda relativa alla specie animale non dichiarata in etichetta è come intensità, leggermente inferiore a quelle degli altri due prodotti PCR.

In un secondo campione non conforme (un hamburger) dichiarato solo bovino, sono state ritrovate tracce di suino (Figura 4.4). Il campione in esame (lane 2) ha fornito come atteso una banda di dimensioni compatibili con l'amplificato relativo alla specie bovina (lane 4). Volendo aggiungere anche delle interpretazioni quantitative all'esperimento, il prodotto PCR "bovino" è nettamente predominante rispetto ad una seconda banda, di più alto peso molecolare. Tale banda si può attribuire all'amplificato di DNA suino, facendo riferimento al controllo positivo caricato nella lane 5. In questo esperimento sono stati analizzati due campioni alimentari contenenti carni bovine (lane 1) e carni suine (lane 3), come ulteriore verifica dell'intera procedura di analisi.

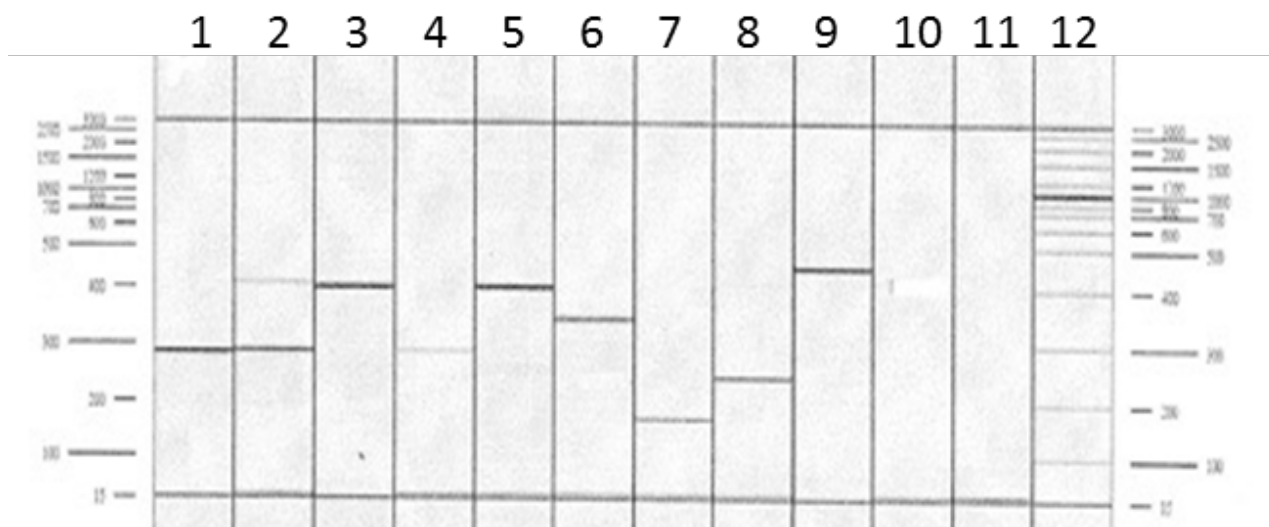


Figura 4.4

Analisi della corsa elettroforetica al QIAxcel (elettroforesi automatizzata) di 3 campioni amplificati con i primers specie-specifici.

1: Campione di fettina di vitello; 2: Campione di hamburger bovino; 3: Campione di salsiccia di suino; 4: Controllo positivo bovino (274 bp); 5: Controllo positivo suino (398 bp); 6: Controllo positivo ovino (331 bp); 7: Controllo positivo caprino (157 bp); 8: Controllo positivo avicolo (pollo/tacchino) (227 bp); 9: Controllo positivo equino (439 bp); 10: Bianco estrazione; 11: Controllo negativo di processo; 12: Marker di peso molecolare (100bp)

In questi due ultimi casi, le analisi hanno rivelato la presenza di DNA relativo a specie animali non dichiarate in etichetta. Mentre nel caso riportato in Figura 4.3. la stima quantitativa fornisce argomenti per supporre la presenza di una quantità non trascurabile di carne di origine suina, nel secondo caso illustrato (Figura 4.4) non si può escludere che la presenza di carne non dichiarata in etichetta sia frutto di una contaminazione accidentale in una qualsiasi fase del processo di produzione dell'alimento.

In conclusione, l'analisi di 51 prodotti commerciali presenti nella grande e piccola distribuzione ha permesso di verificare che per tutti gli alimenti in esame esiste una corrispondenza tra la specie animale dichiarata in etichetta e quella che le analisi molecolari, messe a punto durante questo lavoro di tesi, hanno rilevato. Inoltre, il metodo sviluppato si è rivelato utile per indicare anche casi di contaminazione, ovvero di presenza aggiuntiva di carni di specie animali diverse.

La quantificazione va fatta secondo il criterio percentuale della carne non dichiarata su carni totali presenti nell'alimento e non come percentuale di carne presente nell'alimento tal quale, perchè questo comporterebbe una sottostima dei campioni positivi, in quanto la carne totale presente soprattutto negli alimenti pronti (tipo lasagne, tortellini) è spesso solamente del 4-5% del peso dell'alimento. Allo stato attuale in assenza di un metodo idoneo alla quantificazione è possibile procedere con la definizione del Cut off all'1% secondo le indicazioni previste nell'"Addendum to the EURL-AP protocol: Cut-off to check the 1% level threshold of horse meat in another meat". Attraverso la determinazione del cut-off la procedura permette di stabilire in modo semi-quantitativo se il contenuto di carne non dichiarata in un'altra carne eccede o meno l'1% in frazione di massa.

Inoltre, il metodo sviluppato ha fornito delle indicazioni anche su aspetti quantitativi. Ulteriori studi, e soprattutto, altre metodiche molecolari di analisi potranno in futuro essere impiegate per fornire stime quantitative con una più adeguata precisione analitica.

5. DISCUSSIONE

Le scelte dei consumatori in fatto di alimenti non riflettono semplicemente la necessità di soddisfare le proprie esigenze nutritive, ma anche il loro stile di vita, il loro credo religioso (ad es. l'assenza di carne di maiale per ebrei e musulmani) o i problemi di salute che li affliggono (ad es. l'assenza di arachidi, glutine o lattosio per i soggetti allergici) (Musto, 2006). Tali scelte sono da sempre effettuate sulla base delle informazioni ricevute che, in qualunque forma esse siano (verbali, scritte, visive), devono essere vere e precise, specie per quegli alimenti nei quali, una volta processati, risulta difficile distinguere i vari ingredienti utilizzati nella preparazione. La non corrispondenza tra quanto dichiarato e quanto effettivamente presente nel prodotto acquistato rappresenta una frode alimentare. Gli illeciti sono molteplici. Le frodi alimentari si possono suddividere in due categorie: commerciali (in cui possiamo far rientrare la modifica non conforme del segno identificativo di un prodotto) e sanitarie (quelle che modificando la composizione possono creare adulterazione, sofisticazione e sostituzione) (Rapporto frodi agroalimentari 2015, Fareambiente).

La corretta identificazione di specie rappresenta un punto cruciale nel controllo della qualità alimentare al fine di evitare la frode. Appare fondamentale disporre di un metodo analitico in grado di identificare le specie in maniera inequivocabile e rapida per le implicazioni sanitarie, commerciali e religiose connesse ad un'etichettatura non corretta.

Negli ultimi anni si è sviluppato l'impiego di indagini molecolari basate sull'analisi delle sequenze di DNA polimorfico nel genoma mitocondriale. Oggi l'analisi del gene codificante il citocromo b è stata universalmente adottata per identificare specie animali. Parallelamente allo studio di quale tecnica utilizzare per ottimizzare l'identificazione di specie si è proceduto alla scrittura e validazione del metodo in esame. La validazione di un metodo di prova biomolecolare per l'individuazione, l'identificazione e la quantificazione di specifiche sequenze del DNA in alimenti è un aspetto focale per il laboratorio interessato all'accreditamento da parte di ACCREDIA, ovvero l'Ente Italiano di Accreditamento, nonché l'unico organismo nazionale autorizzato dallo Stato a svolgere tale attività. Il laboratorio in questione (in questo caso l'U.O. di Analisi del Genoma dell'IZSM) sarà così, una volta "accreditato" il metodo, organo garante di: imparzialità e indipendenza. Tale validazione viene effettuata secondo le Linee Guida definite dal Codex Alimentarius (CAC/GL 74-2010) e il protocollo per la progettazione, l'esecuzione e l'interpretazione degli studi sulle prestazioni di un metodo emesso dalla IUPAC nel 1995.

Il metodo utilizzato e validato nell'identificazione di specie in alimenti in questione è una PCR-Multiplex, cioè una PCR end-point che impiega più coppie di primer in un'unica miscela di reazione. I primer sono di varie dimensioni e specifici per diverse sequenze di DNA target. Questa metodica consente di amplificare contemporaneamente diversi segmenti dello stesso gene di interesse utilizzando coppie di inneschi differenti. Prendendo di mira molte specie in un solo esperimento di PCR, le informazioni necessarie possono essere acquisite da un singolo test, che altrimenti richiederebbe l'uso di più reagenti e più tempo per l'esecuzione. I risultati hanno indicato la presenza di ampliconi di buona intensità per ogni singola specie in esame, dimostrando l'assenza di amplificazioni non specifiche.

L'identificazione del DNA negli alimenti trasformati è stato un argomento di studio in numerose pubblicazioni (Meyer *et al.*, 1994). La quantità e la qualità del DNA presente può essere influenzata dalla tipologia di trattamento subito. Per esempio, alcuni studi hanno dimostrato che il DNA viene completamente rimosso durante la produzione di zucchero, 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. Oggi la biologia molecolare è largamente utilizzata per il controllo degli alimenti destinati al consumo umano ed 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). 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. Tutto questo ha portato alla necessità di definire un valore di cut-off, stabilito all'1% di carne in carne dall'EURL, di specie non dichiarate. Al di sotto di tale soglia non si parla di frode ma solo di presenza in tracce. La tecnica utilizzata in questo lavoro ha sempre permesso di poter stabilire la presenza o meno della specie animale ricercata con un'elevata sensibilità che rende visibile anche la presenza in tracce di specie non dichiarate in etichetta. Si sono ottenuti risultati da tutte le matrici analizzate. Spesso, a causa dei trattamenti di trasformazione subiti, il DNA può presentarsi molto degradato e presente in piccole quantità: nonostante ciò la tecnica ha dimostrato di poter identificare tale DNA frammentato in modo corretto.

La presenza di inibitori coestratti insieme al DNA è uno dei maggiori problemi nelle 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 all'analisi. Gli

inibitori possono interferire nei vari passaggi dell'analisi: durante l'estrazione, durante la purificazione possono favorire la degradazione degli acidi nucleici oppure inibire le reazioni di amplificazione (Wilson *et al.*, 1997). In generale, i risultati sono corrispondenti a quanto dichiarato dai produttori in etichetta e solo il 5% non sono conformi. Dai risultati sono emersi due casi in cui le analisi molecolari hanno rivelato la presenza di DNA di specie non dichiarate in etichetta. Nel campione di wurstel dichiarato bovino e suino, sono state ritrovate tracce di pollo; nel campione di hamburger dichiarato solo bovino, sono state ritrovate tracce di suino. Bisogna sottolineare che nei campioni non conformi all'etichetta sono state trovate solo tracce di matrici diverse, non vi è mai stato un episodio di completa o predominante sostituzione. Quindi si può affermare che la PCR Multiplex sviluppata in questo lavoro consente di ridurre il numero di analisi necessarie alla determinazione di ogni campione. La metodica proposta è vantaggiosa sia per il minor tempo impiegato sia per il risparmio dei materiali utilizzati. Inoltre essendo il risultato basato sulla stima in automatico delle dimensioni di un prodotto di amplificazione, senza ulteriori passaggi, permette di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, che rappresentano potenziali fonti di alterazione dei risultati (Lopez-Calleja *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Kesmen *et al.*, 2009; Mininni *et al.*, 2009).

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

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. Grazie alla tecnica della PCR multiplex è stato possibile confermare la conformità o meno delle indicazioni riportate dai produttori di alimenti riguardo le specie presenti nelle miscele di carni analizzate.

Complessivamente i risultati di questo lavoro mostrano che per i campioni analizzati (tutti destinati all'alimentazione umana), i dati sono corrispondenti a quanto dichiarato dai produttori in etichetta. La tecnica ha permesso di rivelare anche due casi che richiedono una più accurata stima quantitativa dei possibili materiali non dichiarati in etichetta. Quindi uno sviluppo futuro di tali prove sarà la messa a punto di una PCR Real Time, in modo da testare velocemente i campioni sia da un punto di vista qualitativo che numerico. E' però necessario aggiungere che le chimiche delle reazioni di PCR quantitative sono decisamente più costose rispetto alle analisi end-point. Per ottimizzare i costi, le analisi qPCR potrebbero essere necessarie solo per quei campioni che mostrano una presenza di DNA non atteso. I primer e le condizioni di amplificazioni impiegate in questo studio già permettono l'allestimento di reazioni "simplex", utili alla quantificazione assoluta o relativa degli ingredienti sospetti. La mancanza di prodotti aspecifici in condizioni di multiplex suggerisce che tale la PCR multiplex impiegata in questa ricerca potrebbe essere impiegata anche come base per lo sviluppo di metodiche mutliplex in real time. Ulteriori studi saranno rivolti verso questa direzione, per il disegno di sonde specie-specifiche adattabili ad un saggio multiplex in qPCR.

7. BIBLIOGRAFIA

Addendum to the EURL-AP protocol (Febbraio, 2013) : Cut-off to check the 1% level threshold of horse meat in another meat.

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.

Anderson, S., de Bruijin, M.H.L., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F., Young, I.G., 1982. Complete sequence of cattle mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology* 156, 683±717.

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 Veterinary Journal* Oct: 34-8.

Che Man Y.B., Aida A.A., Raha A.R., Son R., (2007). Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for Halal verification. *Food Control* 18: 885-889.

Codex Alimentarius (CAC/GL 74-2010) Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific dna sequences and specific proteins in foods.

Desjardins, P., Morais, R., 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology* 212, 599±634.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

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.

Ghovvati, S., M. R. Nassiri, S. Z. Mirhoseini, A. H. Moussavi, and A. Javadmanesh. (2009). Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control*. 20: 696-699.

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*.

Guoli, Z., Mingguang, Z., Zhijiang, Z., Hongsheng, O., Qiang, L.: Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci.*, 1999; 51: 233-236.

Hemmer W., (1997). Foods derived from genetically modified organism and detection methods. *BATS- Report 2/97*, BATS, Clarastrasse 13, 4058, Switzerland.

Hird, H., Goodier, R., Hill, M.: Rapid detection of chicken and turkey in heated meat products using the polymerase chain reaction followed by amplicon visualisation with vistra green. *Meat Sci.*, 2003; 65: 1117-1123.

Il Fatto Alimentare del 19/04/2013.

Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32, 128±144.

ISO/IEC 17025:2005 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.

ISO 5725:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results

- 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.
- 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.
- López-Calleja, I., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P.E., García, T., Martín, R., (2007). Quantitative detection of goats' milk in sheep's milk by realtime PCR. *Food Control* 18: 1466–1473.
- 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.
- Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., Shinmura, Y.: A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci.*, 1999; 51: 143-148.
- 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.
- 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.
- Mullis K.B., Ferrè F., and Gibbs R.A., (1998). “The Polymerase Chain reaction. Birkauer- Vergal, Basel.
- Musto M. Dal benessere degli animali all'accettabilità dei consumatori. AER Club – Edizioni Il Melograno, Milano; 2006.
- M.Musto, M.L.Satriano. A multiplex PCR for the simultaneous detection of bovine and porcine DNA in meat products. *Industrie alimentari*, 2010
- Nebbia G., *Aspetti storici del problema del controllo della qualità delle merci nel mondo antico e nel Medioevo* (1962). *Quaderni di Merceologia*: 327– 380.
- Norma UNI/CEI 70099:2008. *Vocabolario Internazionale di Metrologia. Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM). 2008*
- O. İrfan İLHAK, Ali ARSLAN. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique. Department of Food Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Firat University, Elazig TURKEY. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2007; 31(3): 159-163.
- Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)-1995.
- 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.”
- Rapporto frodi agroalimentari 2015, Fareambiente.
- Reg.CE N.882/2004 del Parlamento Europeo del Consiglio 19/04/2004.

- 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.
- Saez, R., Sanz, Y., Toldrá, F.: PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products. *Meat Sci.*, 2004; 66: 659-665.
- 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.
- S. K. Verma and L. Singh. Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. *Molecular Ecology Notes* Volume 3, Issue 1, pages 28–31, March 2003.
- UNI EN ISO 22174:2005 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - General requirements and definitions.
- Ward RD1, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Oct 29;360(1462): 1847-57.
- 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.

8. RINGRAZIAMENTI

Un sincero ringraziamento al tutor accademico Prof. Giancarlo Barbieri ed al tutor dell'IZSM dott.ssa Federica Corrado per la loro grande disponibilità nel corso di questi anni e per la grande opportunità concessami...

Un grazie dal profondo del cuore a Mimmo, la mia coscienza intellettuale...

Ed infine a te , Amore... che sei stato le mie dita quando io ero troppo stanca...

Grazie!