UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Dottorato di ricerca in Scienze Veterinarie

Coordinatore: Prof. Adriana Ferlazzo

Curriculum: Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

Validazione di un sistema di PCR Real Time per la caratterizzazione genetica di specie in prodotti a base di carne e messa a punto di un sistema Multiplex PCR per l'identificazione di specie animale e la tracciabilità genetica

Tesi di:
Dott. Mario Cosenza

Tutor:
Ch.mo Prof. Enrico D'Alessandro

Ciclo XXIX

INDICE

1. QUADRO NORMATIVO

1.1 Sicurezza Alimentare……...……..……6

1.2 Regolamento CE 178/2002……..…….....7

1.3 Pacchetto Igiene…….9

1.4 Etichettatura dei prodotti alimentari…….……..….12

1.5 Etichettatura delle carni bovine……...……15

1.6Tracciabilità…….…….……17

2. FRODI

2.1 Frodi Alimentari: Cenni Storici.....…...…...…..…...…….….….……...……19

2.2 Frodi Alimentari: Definizione……....……..20

2.3 Natura delle Frodi Alimentari……..22

2.4 Tipi di Frodi Alimentari……...25

3. IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

3.1 Evoluzione delle metodiche identificative……...28

3.2 DNA Barcoding……...30

3.2.1 DNA Mitocondriale……...…...……34

3.3 PCR end-point……..37

3.4 Real Time PCR……40

3.4.1 Metodi di Rilevazione del segnale……43

3.4.1.1 Molecole di legame al DNA……..44

3.4.1.2 Sonde molecolari a DNA……...45

3.5 Multiplex Real Time PCR……...50

3.6 Ottimizzazione della reazione di Real Time PCR……...53

3.7 Analisi dei dati e parametri di valutazione……..58

3.8 Importanza della validazione del metodo…….……...63

3.9 Microarray……68

4.0 Microsatelliti……71

4. OBIETTIVO

4.1 Obiettivo del lavoro…….75

5. MATERIALI E METODI

5.1 Preparazione dei campioni……...……78
5.2 Estrazione del DNA…….81
5.3 Quantificazione del DNA……87
5.4 Amplificazione e Sequenziamento del DNA……...……89
5.5 Real Time PCR……....……94
5.6 Implementazione del sistema Multiplex Real Time PCR……..……100
5.7 Real Time PCR sui prodotti commerciali……..108
5.8 Screening in Microarray……..……..108
5.9 Tipizzazione dei marcatori STR……113

6. RISULTATI

6.1 Quantificazione degli estratti di DNA…...……117
6.2 Sequenziamento del DNA……..118
6.3 Analisi dei dati di Real Time PCR…….119
6.4 Analisi dei dati di Multiplex Real Time PCR……...…….131
6.5 Analisi dei dati di Array e Real Time PCR per le matrici commerciali.……..…….138
6.6 Analisi dei marcatori STR…….145

7. DISCUSSIONE

7.1 Estrazione del DNA……...……148
7.2 Real Time PCR ……..……149
7.3 Multiplex Real Time PCR……...……..154
7.4 Chip di Array e Real Time PCR per la matrici commerciali.……156
7.5 Marcatori STR……...159

8. CONCLUSIONI…….162

9. BIBLIOGAFIA……..…….165

SUMMARY

Due to the recent food scandals the public health protection has become over the last years a critical element on which today the EU has focused considerable attention. Episodes such as BSE, dioxin contamination and more recently the fraudulent manipulation of meat (horsegate), have negatively affected the European markets and highlighted the weakness of the agrifood system. To maintain a high quality and safety standards throughout the food chain, efficient systems are needed to put into effect in order to ensure a free of fraud food production. The identification of species in a food mixture is today one of the major concern because of the great variability of food products and it is therefore necessary an accurate control of the stated ingredients aimed to exclude both the presence of contaminants and the replacement of a high-cost species by a low-cost one. When the morphological analysis is no longer able to provide a valid aid to the identification of the species of a food product the molecular methods must be employed to meet these requirements. Nowaday the analytical method for the species identification in food of animal origin is based on the Real Time PCR as it is sensitive and specific, reliable and repeatable even in processed foods, both of complex composition and high heat-treated. The goal of this work was the development and the validation of reliable molecular techniques aimed to the genetic characterization of species in meat food products. Starting from a sample of raw food matrices belonging to the Bovine, Sheep, Pig and Horse species, a variety of PCR-based techniques have been applied for the animal species identification in food mixture and commercial products. To this aim the above samples were thoroughly mixed to create mixtures test with different percentage ratio in a final weight of 100 g using as reference the minimum threshold of 1% of adulterant in the mixture (EURL operational protocol). A total of 145 samples have been collected for DNA extraction using two different commercial kits and one automated method. Two different target regions within the mitochondrial genome were therefore selected for our purposes. A specific portion of the mtDNA cyt B was PCR-targeted for species identification using TaqMan probes and a couple of primer for each species investigated. Subsequently we developed a Real Time PCR duplex assay

specifically designed for the dection of Beef, Sheep and Pork using TaqMan MGB molecular probes targeted on a variable region of the mtDNA rDNA 12S. Moreover a commercial microarray chip was also employed as qualitative screening tool to detect banned species in commercial food (n=25). Finally in order to provide an overview of the complex food safety network we genetically typed a group of 118 bovine on the basis of 11 microsatellite loci for the identity verification by molecular fingerprinting. The singleplex Real Time PCR test has shown amplification curves for all samples tested in a Ct range spanning from 18.05 for the ovine species to 21.67 for the equine. Moreover the calibration curves for each species built on six concentration points (100 ng/uL - 0.001 ng/uL) allowed us to estimate those parameters useful for the validation of the method. Based on this the LOD and the LOQ of the assay were calculated. The LOD value was set in the range of the standard 5 (10^{-3} ng/µL, 0.01%) for the Bovine and the Ovine species and in the range of the standard 4 (10^{-2} ng/µL, 0.1%) for the Swine and Equine species. Furthermore a statistical approach was also adopted to measure LOD and LOQ of the assay. Specifically the values of the LOD ranged from 0.0008 ng/µL (0.8 pg) to 0.0013 ng/µL (1.3 pg) respectively for the Ovine and Bovine species. The LOQ value spanned from 0.0009 ng/µL (0.9 pg) for the Ovine species to 0.0028 ng/µL (2.8 pg) for the Bovine species. Overall amplification curves were obtained in the range of the 100% to 0.001% equivalent to 10 ng/µL and 10^{-4} ng/µL of DNA respectively. Concerning the duplex Real Time PCR assay the absence of aspecific amplicons was assessed by analysis of melting curves which showed the specificity of the probes designed. Despite the high affinity of the primers/probes pairs only weak amplification curves below the threshold were recorded at the value of 10^{-4} ng/µL over the 40th cycle therefore determining a LOD values of 10^{-3} ng/µL (0.01%) for all species investigated. According to the EURL operating protocol a cut-off value for the screening array has been set to assign positivity to the species, equivalent to a LOD of 0.1 - 0.5%. Out of 25 samples screened a 40% of them has shown a match to one or more species not listed in the product specifications. As expected no sample showed positive results for the Equine target while 5 samples were founded additioned by Chicken and 4 from Pig. Only one sample showed positivity to Turkey while not significant signals below the cut-off values have been highlighted for

other matrices to the Chicken and Turkey species. A singleplex and duplex Real Time PCR test were therefore directed specifically toward the undeclared species detected at the screening stage in order to confirm these findings. The assays were then applied on 6 samples in which the adulterant was represented exclusively by Swine or Bovine and the Ct values at the 1% threshold were detected. The analysis of the amplification curves confirmed the presence of the adulterants detected at the screening stage. Moreover the intensities of the amplification curves showed strong positive signals for the adulterants exhibiting Ct values slightly different to those of the main ingredient. Overall out of 10 positive samples to undeclared species 8 of them were come from small shops and local butchers while the remaining from companies. The genetic traceability method used in this work was employed on blood and tissues cattle samples coming from 8 different farms and collected from several area of the Sicily. The electropherograms analysis has demonstrated some irregularities involving 4 of the 8 farms investigated. The genetic mismatch was represented by a non-correspondence result with the reference sample while a full correspondence was found with the genetic profile of more than one sample within the same group. Particularly, among these only one mismatch was due to a single allelic difference existing at 1 locus of the 11 analyzed. As a result the microsatellite panel used in this study supported the reliability of the test. The data obtained have demonstrated that the use of biomolecular methods represent a reliable control tool for the verification of the traceability system at each stage of the production chain. In conclusion the investigation methods applied in this study represented a valid contribution in the veterinary practice and to the development of the identification methods for the genetic characterization of species as well as they have been demonstrating to be useful both in the field of food safety and public health.

1. QUADRO NORMATIVO

1.1 Sicurezza Alimentare

Secondo la definizione della FAO al World Food Summit del 1996 *"La sicurezza alimentare esiste quando ciascun individuo […] ha accesso a una quantità di cibo sufficiente, sicuro e nutriente in modo da soddisfare i bisogni […] per garantire una vita sana ed attiva".* Il cibo rappresenta dunque uno tra i bisogni primari dell'uomo e come tale va protetto e garantito. La tutela della salute, relativamente al settore della sicurezza alimentare, è divenuta ormai oggetto di notevole interesse sia da parte del legislatore che da parte dei cittadini, a causa dell'ormai sempre più incalzante globalizzazione dei mercati dei prodotti alimentari. In seguito alle prime crisi del settore alimentare tra gli anni '90 e 2000, i consumatori, oggi, manifestano una crescente ricerca di sicurezza alimentare derivata da una maggiore informazione e consapevolezza. In particolare, durante tale periodo, le crisi alimentari si susseguono rapidamente ed episodi caratterizzati da eventi di forte risonanza mediatica quali BSE (encefalopatia spongiforme bovina, cosiddetta mucca pazza), uova e pollo alla diossina e, più recentemente, la manipolazione fraudolenta di preparati alimentari (scandalo della carne equina), hanno determinato un forte effetto di sfiducia, disorientamento e rifiuto a priori del consumatore nei confronti dei produttori del settore. Tali episodi hanno chiaramente impattato negativamente il mercato europeo e ancor di più, probabilmente, messo in luce la fragilità del sistema agroalimentare da un punto di vista della sicurezza. La libera circolazione di alimenti sicuri, a causa dell'abbattimento delle barriere doganali, è pertanto diventata uno dei princìpi cardini del mercato comunitario congiuntamente ad una indubbia regolamentazione di ciò che concerne gli aspetti fondamentali della salute e del benessere dei cittadini. È dunque in un contesto critico di tale rilievo che si fa largo la necessità di riacquistare la fiducia del consumatore, nei prodotti alimentari e nelle istituzioni, e di dare una decisa risposta alla crisi del settore mediante adozione di elevati standard di sicurezza. Pertanto, nel Gennaio del 2000, la Commissione Europea emana il Libro Bianco della Sicurezza Alimentare (1), enunciando di fatto, per la prima volta, una serie

di misure finalizzate alla gestione e organizzazione della sicurezza alimentare in maniera coordinata e integrata, formulando dunque i seguenti principi generali:

a. Revisione di un quadro giuridico che copra tutti gli aspetti della sicurezza alimentare mediante l'introduzione del concetto di controllo di filiera, dalla materia prima al prodotto finito.
b. Creazione di un'Autorità Alimentare Europea incaricata dell'elaborazione di pareri scientifici inerenti tutti gli aspetti della sicurezza alimentare, la gestione dei sistemi di allarme rapido (RASFF) e la comunicazione dei rischi ad essa connessi.

Tale libro raccoglie dunque in un unico documento i diversi aspetti della sicurezza alimentare, introducendo il principio del "from farm to fork" (dal campo alla tavola), secondo il quale ciascuno anello della catena di produzione è complesso e sensibile quanto l'altro e solo agendo lungo ogni anello dell'intera filiera si può assicurare un efficace e integrato sistema di protezione e monitoraggio della salute dei consumatori. Il Libro Bianco, inoltre, pone le basi alla successiva introduzione del concetto di tracciabilità e rintracciabilità degli alimenti e all'applicazione del principio di precauzione nella gestione del rischio nonchè la sua valutazione e comunicazione. Il risultato di ciò è dunque l'elaborazione, tra il 2002 e il 2004, di un pacchetto di norme comunitarie in fatto di igiene e sicurezza alimentare le quali rappresentano di fatto l'espressione del nuovo quadro giuridico comunitario. Viene emanato pertanto il Regolamento CE 178 del 2002 (2) e abrogate le ex direttive comunitarie CEE/93/43 e CE/96/3 per fare spazio ai Regolamenti CE 852 (3), 853 (4) e 854 (5) del 2004, attuati in Italia con il D.Lgs 193/07.

1.2 Regolamento CE 178/2002

Con la stesura del Libro Bianco della Sicurezza Alimentare viene emanato il Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo, il quale rappresenta la prima legge comunitaria del settore alimentare volta a regolare tutte le fasi della produzione, trasformazione e distribuzione di alimenti e mangimi per garantire il più alto livello di protezione della salute dei cittadini e dei consumatori. Esso stabilisce i princìpi e i

requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce un'autorità garante della sicurezza (EFSA, Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) nonchè un Sistema di Allerta Rapido (RASFF) per la gestione del rischio e fissa le procedure nel campo della sicurezza alimentare. Come già definito, introduce il concetto di filiera e definisce la responsabilità legale di tutti i soggetti coinvolti, a vario titolo, nella produzione, importazione e commercializzazione del prodotto. Individua altresì il ruolo dell'Autorità Sanitaria deputata alla verifica del quadro normativo di riferimento da parte dei suddetti operatori del settore alimentare (OSA), mediante applicazione di procedure di controllo, audit e ispezione. Tale regolamento inoltre tutela il consumatore relativamente al diritto di informazione sulle caratteristiche del prodotto alimentare e fornisce alle Autorità Sanitarie di controllo, i mezzi e le informazioni necessarie all'avvio delle eventuali procedure di ritiro/richiamo del prodotto/mangime nel caso di un concreto rischio sanitario, qualora non sia stato gia messo in opera dagli operatori stessi mediante idonee procedure. Tale obiettivo è raggiunto mediante l'estensione e una migliore precisazione del concetto di rintracciabilità di filiera obbligatoria (in quanto già introdotto negli anni 90 nel settore ortofrutta), definito dall'art. 3 del summenzionato Regolamento come "*la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione"*. Di notevole importanza e relativo alla stesura di questo lavoro, è la definizione dell'articolo 8 del presente regolamento, inerente la tutela degli interessi del consumatore. Il comma 1 definisce infatti gli obiettivi prefissati dalla legislazione alimentare, ovvero "*tutelare gli interessi dei consumatori […] per consentire […] di compiere scelte consapevoli in relazione agli alimenti che consumano. Essa mira a prevenire le seguenti pratiche:*

a) le pratiche fraudolente o ingannevoli;

b) l'adulterazione degli alimenti;

c) ogni altro tipo di pratica in grado di indurre in errore il consumatore;

Tale articolo evidenzia quale sia uno degli obiettivi che il presente regolamento intende perseguire, includendo la tutela del consumatore come punto cruciale della normativa europea verso qualsiasi pratica ingannevole in grado di trascinarlo in errore. La

consapevolezza di scelta del consumatore attraverso un'informazione leale pone quindi una delle finalità di tale articolo, in merito sia alla salute e alla sicurezza del consumatore come benessere, ma anche alla salvaguardia dei suoi interessi, economici per esempio. La misura più rappresentativa e di facile accesso volta a garanzia del consumatore è rappresentata dalla etichettatura, la quale deve fornire indicazioni chiare e ben visibili del prodotto alimentare ricercato.

1.3 Pacchetto Igiene

Nel 2004 viene emanato il cosiddetto Pacchetto Igiene, comprendente una serie di regolamenti finalizzati a garantire il più alto livello di protezione sulle produzioni alimentari, definendo specifici requisiti per l'igiene dei prodotti alimentari (animali e non) destinati al consumo umano e per i controlli. Tale pacchetto di norme include i Regolamenti CE 852/2004, CE 853/2004, CE 854/2004 e CE 882/2004. La promulgazione di questi testi legislativi ha mirato chiaramente a uniformare le legislazioni dei diversi paesi comunitari, definendo i medesimi requisiti di sicurezza e i medesimi standard relativi ai controlli sanitari cui sono sottoposti i produttori, promuovendo di fatto la libera circolazione di prodotti tra gli stati membri. Il pacchetto igiene ingloba in sè dunque tutti gli aspetti della catena produttiva, dalla produzione alla distribuzione e trasporto e si rivolge agli operatori del settore alimentare (OSA), specificatamente per i regolamenti 852 e 853, e alle Autorità competenti, specificatamente per i regolamenti 854 e 882, relativamente all'espletamento delle attività di controllo sanitario. Il Regolamento CE 852/2004 definisce dunque le norme generali da applicare su qualunque prodotto alimentare e pertanto individua nell'OSA l'unico responsabile della salubrità del prodotto. Essi infatti garantiranno che ciascuna fase soddisfi i requisiti igienico-sanitari prescritti dal regolamento, mediante adozione del sistema di autocontrollo HACCP, ad eccezione dei produttori primari, i quali comunque seguiranno dei manuali di corretta prassi igienica. Per quanto concerne il regolamento CE 853/2004, esso integra il precedente e detta le norme specifiche per gli alimenti di origine animale trasformati o meno (Tabella 1). Secondo l'articolo 2 del Regolamento 852/2004, sono definiti prodotti non trasformati quei *prodotti alimentari non sottoposti a*

trattamento, compresi prodotti che siano stati divisi, separati, sezionati, affettati, disossati, tritati, scuoiati, frantumati, tagliati, puliti, rifilati, decorticati, macinati, refrigerati, congelati, surgelati o scongelati; il medesimo articolo definisce anche il concetto di trattamento di un alimento come *qualsiasi azione che provoca una modificazione sostanziale del prodotto iniziale, compresi trattamento termico, affumicatura, salagione, stagionatura, essiccazione, marinatura, estrazione, estrusione o una combinazione di tali procedimenti*; vengono invece riconosciuti come prodotti trasformati quei *prodotti alimentari ottenuti dalla trasformazione di prodotti non trasformati. Tali prodotti possono contenere ingredienti necessari alla loro lavorazione o per conferire loro caratteristiche specifiche*. La normativa 853/2004, in particolare, non si applica agli esercizi di vendita al dettaglio per i quali si applicano le disposizioni del Regolamento 852/2004, ed è quindi indirizzata ai grossi stabilimenti comunitari per la commercializzazione all'ingrosso, sul territorio europeo o extra europeo (impianti di macellazione, salumifici, mercati ittici etc). È importante sottolineare come il presente regolamento non si applica inoltre agli alimenti che contengono prodotti di origine vegetale e prodotti trasformati di origine animale (cosiddetti prodotti composti, definizione desumibile dall'articolo 1 del Regolamento 853/2004). Tuttavia, i prodotti trasformati di origine animale utilizzati per preparare detti alimenti composti devono essere manipolati conformemente ai requisiti di tale regolamento. Esso rimarca ancora una volta le responsabilità degli operatori del settore alimentare, coinvolti a qualsiasi titolo nelle fasi di produzione, trasformazione o commercializzazione nella obbligatorietà dell'apposizione di un contrassegno identificativo. In particolare ciò riguarda l'apposizione del bollo sanitario per le carni fresche secondo quanto disposto dall'Allegato I, Sezione I, Capo III del Regolamento 854/2004 o apposizione di un marchio di identificazione ai sensi dell'Allegato II, Sezione I, del Regolamento 853/2004 ai prodotti di origine animale non trasformati, trasformati ed ai prodotti primari individuati come tali secondo il medesimo regolamento.

PRODOTTI NON TRASFORMATI

Carni Fresche - Carni Macinate - Carni Separate Meccanicamente (CSM)
Preparazioni di carne
Sangue
Prodotti della pesca freschi
Molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini vivi
Latte fresco
Uova e uova liquide
Cosce di rana
Lumache
Miele
Altri
Prodotti non trasformati contenenti prodotti di origine vegetale
(spiedini di carne, filetti di pesce)

PRODOTTI TRASFORMATI

Prodotti a base di carne (salame, prosciutto)
Prodotti a base di pesce (pesce affumicato, pesce marinato)
Prodotti a base di latte (latte trattato, formaggi, yogurt)
Ovoprodotti
Grassi animali trasformati
Ciccioli
Gelatina
Collagene
Stomaci e budella trattate
La combinazione di prodotti trasformati: prosciutto e formaggio
Prodotti ottenuti con particolari tecniche (es. formaggio con latte pastorizzato)
Sostanze che potrebbe essere aggiunte all'elenco (salse con carne, yogurt alla frutta, formaggio alle erbe, gelato con cioccolata)

PRODOTTI COMPOSTI

Pizza
Paste contenenti prodotti di origine animale trasformati
Piatti pronti
Prodotti da forno/ biscotti con creme, con burro
Panini con prosciutto/ Formaggio

Cioccolato al latte
Prodotti trasformati in cui un componente è stato sostituito con un ingrediente di origine vegetale (es. Prodotti a base di latte dove la componente grassa è stata sostituita con grassi o oli vegetali)
Preparazioni di uovo come maionese

Tabella 1. Tabella riassuntiva dei prodotti di origine animale in riferimento al Regolamento CE 853/2004. Linee Guida applicative del Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consgilio sull'Igiene dei Prodotti di Origine Animale Regione Lazio.

Come gia definito, la normativa 853/04 non si applica agli alimenti composti anche solo parzialmente da prodotti vegetali, come ad esempio pasta farcita a base di carne. Il presente regolamento definisce infatti i prodotti a base di carne come quei *prodotti trasformati […] in modo tale che la superficie di taglio permette di constatare la scomparsa delle caratteristiche delle carni fresche*. Diversa è invece la definizione di preparazioni di carni, ovvero *carni fresche [...] hanno subito un'aggiunta di prodotti alimentari, condimenti o additivi o trattamenti non sufficienti […] ad eliminare quindi le caratteristiche delle carni fresche*. Pertanto le paste con farciture a base di carne, tra cui tortellini o ravioli, rientrano tra i prodotti a base di carne normati nel presente regolamento esclusivamente a causa dei trattamenti di tipo trasformativi subiti per la farcitura stessa, e cioè la cottura, salatura e a volte pastorizzazione ed essiccazione del prodotto finito. Tali prodotti rientrano altresì anche fra le paste alimentari speciali, regolamentati dalla normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari, D.P.R. 187/2001 (6) in sostituzione del precedente Decreto del Ministro della Sanità n. 264/1998.

1.4 Etichettatura dei prodotti alimentari

Come evidenziato in precedenza, ai fini di una corretta e trasparente informazione del consumatore, i prodotti alimentari rispondono per la fase di etichetattura secondo quanto disposto dal D.Lgs 109/1992 (8), e integrato dal D.Lgs 181/2003 (7) e successivi. Essa deve essere effettuata in modo da *non indurre in errore l'acquirente sulle caratteristiche del prodotto alimentare e precisamente sulla natura, sulla identità, […] sulla composizione, sulla quantità, […] sull'origine o la provenienza […]*. Inoltre,

realtivamente al settore carni, quando esse sono *utilizzate come ingredienti di un prodotto alimentare sono indicate con il nome della specie animale [...],* obbligando di fatto il produttore alla precisa indicazione della/e specie di carne caratterizzanti il prodotto oltre alla precisazione della quantità percentuale dell'ingrediente "carne" presente nel prodotto, con alcune limitazioni. Questo ultimo concetto pone infatti dei confini a tali indicazioni. Il D.Lgs 109/1992, norma quadro di riferimento in Italia in fatto di etichettatura, si applica a tutti i prodotti alimentari venduti sfusi (frutta, ortaggi freschi), preincartati (pane, carne fresca, formaggi o salumi al taglio) o preconfezionati (preimballati in assenza dell'acquirente), destinati comunque al consumatore finale e alla collettività nazionale. La distinzione di tali tipologie di prodotto è fondamentale ai fini del sistema di etichettatura in quanto risponderanno ai requisiti previsti da differenti articoli ma del medesimo decreto. Tale decreto è stato più volte integrato da norme nazionali e, oggi, a livello comunitario con l'ultima disposizione, il Regolamento CE 1169/2011 (9), il quale elimina le definizioni di alimento preincartato (per il quale dunque tale regolamento europeo non si applica) e sostituisce la dicitura di alimento preconfezionato con il termine preimballato, esplicitando che sotto tale definizione non sono da includere gli alimenti imballati al punto vendita (ex preincartati). Entrambe le normative, comunitaria e nazionale, descrivono la modalità di etichettatura anche per gli alimenti composti, ovvero caratterizzati da ingredienti composti, vale a dire quell'ingrediente utilizzato per la realizzazione di un prodotto, il quale, a sua volta, è composto da piu ingredienti (es. Farcitura di un croissant). Secondo la direttiva europea 2003/89 (che modifica la Direttiva 2000/13) e recepita in Italia con il recente D.Lgs 114/2006 (10), l'indicazione degli ingredienti di un ingrediente composto può essere trascurata se l'ingrediente rappresenta meno del 2% in peso del prodotto finito, modificando di fatto i D.Lgs 109/92, il D.Lgs 68/2000 ed il D.Lgs 181/2003 (ex regola del 25%). Ulteriormente dovrà essere riportata la quantità percentuale dell'ingrediente evidenziato nel prodotto, la cossiddetta QUID (Quantitative Ingredient Declaration), calcolata al momento del suo utilizzo (e non sul prodotto finito) e solamente in quei casi in cui il nome dell'ingrediente/i figura nella denominazione di vendita (Yogurt alle fragole o Bastoncini di pesce) o è utilizzato per caratterizzare il prodotto o messo in risalto con immagini o ancora se espressamente previsto dalla normativa vigente (es. la pasta all'uovo richiede 200g di uova / Kg di

semola). L'apposizione del quid vale anche per gli ingredienti degli ingredienti composti, sottostando alle medesime regole anzidette, ovvero se trattasi di un prodotto con denominazione di vendita generica (es. Pasta ripiena), non vi è alcun obbligo da parte del produttore di apporre il quid in quanto nessun ingrediente è messo in risalto rispetto agli altri o indicato nella denominazione del prodotto. Allo stesso modo però, laddove l'elemento carraterizzante è indicato nella denominazione di vendita (es. Pasta farcita con carne o Ravioli di carne), dovrà essere apposta la quid dell'ingrediente "carne" mediante dicitura percentuale della/e specie di carne presente. Ancora, l'apposizione del quid risulta obbligatoria quando l'ingrediente è genericamente associato dal consumatore alla denominazione di vendita (es. Carne in scatola o Sugo alla Bolognese): in questo caso il consumatore associerà il prodotto alla presenza di carne, di cui occorrerà fornire le quantità e la tipologia. È bene definire anche come il regolamento CE 1169/2011 ha recentemente introdotto (Aprile 2015), mediante l'emanazione del Regolamento di esecuzione UE 1337/2013, l'obbligo di indicazione del paese di origine o del luogo di provenienza delle carni fresche, refrigerate o congelate di animali della specie suina, ovina, caprina e di volatili. Tale normativa rappresenta in conclusione la risposta alla crescente richiesta di trasparenza dei consumatori nella suddetta filiera, completando, seppure parzialmente, un lungo percorso di etichettatura imposto dalla spinta negativa delle crisi alimentari del settore di qualche decennio fa. In particolare, con l'entrata in vigore di tale regolamento, l'etichetta dovrà contenere informazioni in merito al paese di allevamento e macellazione o al paese di origine dell'animale solo se questo è nato, allevato e macellato in un unico Stato. Ancora, viene esplicitato anche per dette tipologie di animali, i concetti di tracciabilità e in particolare viene disposto l'applicazione di un codice della partita che identifica le carni fornite al consumatore al fine di garantire, in ogni fase della produzione e distribuzione, il collegamento tra le carni e l'animale. Il regolamento stabilisce inoltre l'obbligo per tutti gli OSA, coinvolti a vario titolo nella filiera delle suddette tipologie di carni, a munirsi di un sistema di identificazione e di registrazione degli animali. La definizione in questione appare chiaramente di natura generica e, dunque, affida alla responsabilità dell'operatore stesso l'onere di adottare il sistema più efficiente per garantire una corretta trasmissione delle informazioni lungo l'intera filiera. Sebbene la normativa segni un punto di svolta in materia di etichettatura

per la categoria “non bovina”, dalla nuova norma restano ancora escluse la carne di coniglio e quella di cavallo.

1.5 Etichettatura delle carni bovine

A causa della instabilità dei mercati delle carni bovine determinate dalle ormai note crisi del settore, la comunità europea ha inteso rafforzare la fiducia nel consumatore prevenendo l’atto dell’inganno e sviluppando dunque un sistema informativo in grado di fornire precise indicazioni al consumatore. Le diverse modalità di vendita delle carni bovine pone tali prodotti a rispettare requisiti specifici del settore o quelli di carattere generale sull’etichettatura dei prodotti alimentari (vedi paragrafo precedente). Si rende quindi necessaria la transizione da un sistema volontario di etichettatura ad uno cogente comunitario mediante l’introduzione di un efficace sistema identificativo e di registrazione dei bovini, nonchè un sistema specifico e universale di etichettatura per tale categoria. Per rispondere dunque a tali requisiti, il legislatore introduce a livello comunitario i Regolamenti CE 1760/2000 (11) e CE 1825/2000 (12), i quali prevedono, mediante appositi requisiti, la modalità di etichettatura attraverso la definizione di un sistema cogente e uno facoltativo e la specifica individuazione e registrazione dei bovini in modo da garantire il nesso tra l’identificazione delle carni e l’animale stesso per la tracciabilità dei capi ai fini veterinari, epidemiologici e sanitari (malattie infettive). Per quanto concerne l’identificazione e la registrazione dei capi, il Titolo I del presente regolamento definisce all’art. 3 i sistemi di identificazione bovina e, nello specifico, l’introduzione di elementi quali:

-marche auricolari anti manomissione, 2 per capo e applicate entro 20 giorni dalla nascita;

-passaporti per tutti i nuovi capi nati entro 14 giorni dalla notifica della nascita;

-registri di stalla;

-banca dati informatizzata come sistema di identificazione degli allevamenti e dei capi bovini per le gestione del flusso dati, la cosiddetta Banca Dati Nazionale (BDN) dell’anagrafe bovina; Tale sistema informatico è operativo dal 31 dicembre 1999, con obbligo di identificazione di tutti i nuovi capi nati a partire dal Gennaio 1998. L’Anagrafe

Bovina rappresenta dunque un supporto informatico di estrema rilevanza nella trasmissione di informazioni autentiche al consumatore, utile per una corretta etichetattura e punto cardine della tracciabilità del settore. I consumatori saranno dunque in grado di accedere al sistema informatico, conoscendone l'identificativo capo, e reperire quelle informazioni anagrafiche di interesse. Chiaramente, un sistema così sensibile è basato sulle certificazioni dei Servizi Veterinari dell'iscrizione del capo alla BDN.

Al titolo II invece vengono specificati i criteri e le modalità dell'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carne. Le nuove etichette dovranno riportare in via obbligatoria e distintamente:

-un codice di riferimento per garantire il sistema di tracciabilità fra la carne e l'animale di provenienza, il quale può essere rappresentato dal numero di identificazione del capo;

- il numero di approvazione del macello presso il quale è stato macellato l'animale e lo Stato di provenienza;

- il numero di approvazione del laboratorio di sezionamento presso il quale è stata sezionata la carcassa e lo Stato di provenienza;

-Stato di nascita e in cui ha avuto luogo la fase di ingrasso;

Il regolamento prevede altresì un sistema di etichettatura facoltativo basato sull'apposizione della data di macellazione, razza del bovino, età e categoria (vitello, manzo, vacca, toro, giovenca). Sono definite inoltre le modalità di etichettatura per la carne venduta a taglio nell'esercizio di vendita, dove questa può essere sostituita con una informazione fornita per iscritto e in modo visibile al consumatore (es. cartello al banco frigo), contenente però le stesse informazioni previste in etichetta; permane comunque l'obbligo dell'apposizione dell'etichetta sul singolo pezzo per le carni preincartate negli esercizi di vendita e preconfezionate. Quale sia la modalità di informazione rivolta al consumatore (etichetta o cartello), esse devono comunque sempre permettere di rilevare la connessione tra le carni poste in vendita sul banco e il singolo animale

1.6 Tracciabilità

La possibilità di indicare su un dato prodotto finito l'origine o la sua provenienza è strettamente correlata all'adozione di un adeguato sistema di identificazione, che consenta a tutti gli operatori della filiera di conoscere la "storia" di quel prodotto.

Come già definito dal Regolamento 178/2002, il sistema di tracciabilità ci consente di seguire il percorso di un prodotto alimentare in tutte le sue fasi della filiera, dal campo alla tavola. Il concetto di tracciabilità ha in realtà insito nel suo significato un duplice aspetto, realtivo al fatto di potere tracciare a ritroso un prodotto, cioè da valle a monte del processo produttivo, ricostruendone quindi la sua origine (rintracciabilità). Tale principio rende quindi possibile l'individuazione della fonte di rischio mediante l'impiego di sistemi di identificazione, quali codice a barre o etichetta, recante tutte quelle informazioni necessarie per tracciare a ritroso ciascun passaggio del processo produttivo, il cosiddetto one step backward, one step forward, dove di fatto la *conditio sine qua non* è l'avere tracciato. Di fatto però le disposizioni obbligatorie emanate nel campo della rintracciabilità non costituiscono altro che un'integrazione alle già esistenti procedure di gestione del rischio sanitario cui gli operatori del settore sono sottoposti, come definito dal piano di autocontrollo del sistema HACCP. Sicuramente la definizione di rintracciabilità integra un sistema già esistente e fornisce le informazioni e la strumentazione alle autorità sanitarie deputate al controllo ufficiale per l'individuazione delle diverse responsabilità in caso di rischio. La rintracciabilità dunque non rappresenta un sistema di sicurezza in sè in grado di eliminare tutti i rischi derivanti dalla catena produttiva, ma assume per lo più un ruolo di controllore che di certo ne argina le conseguenze, grazie ad una maggiore attenzione sul processo produttivo più che sul prodotto. Ad oggi è ancora molto vasto e dibattuto il panorama della tracciabilità e specificatamente relativo alla scelta del metodo più efficace per una garanzia di tracciabilità. Di certo la garanzia di una corretta identificazione degli animali rappresenta l'elemento di base in grado di individuare e limitare eventuali frodi del settore. Come già accennato, i sistemi adottati oggi per l'identificazione sono numerosi, da quella tradizionale mediante marche auricolari, boli endoruminali ed etichette, sino alle immagini retiniche, etichette elettroniche e tipizzazione genetica. L'impiego di un metodo o di un altro è di certo determinato dalla ricaduta economica che il sistema ha

sull'operatore il quale però ne trae un sicuro beneficio economico e di immagine per la sua attività. Complessivamente, un sistema di tracciabilità, secondo Golan (13), dovrebbe essere caratterizzato da parametri quali larghezza, profondità e precisione. Tali parametri si riferiscono rispettivamente alla quantità di informazioni che è possibile reperire e dunque registrate per quel dato animale, alla profondità del sistema produttivo ovvero di quanto il sistema approntato è in grado di procedere a ritroso nel ricostruire l'evento e, infine, con quale grado di precisone si è certi dei movimenti di quel prodotto alimentare lungo la filiera, contenuti entro un certo intervallo di errore. Di contro però, esistono delle problematiche legate al sistema di tracciabilità, imputabili spesso all'origine, ovvero alla corretta identificazione dei capi che si ripercuote quindi sull'intera filiera. L'inesattezza del marchio auricolare, la perdita di uno o la totale assenza, rientrano tra i maggiori problemi riscontrati durante i controlli legati alla identificazione dei capi, cosi come il rischio di alterazione fraudolenta, ad oggi ancora frequentemente ravvisato. Problematiche legate quindi all'identificativo del capo, risultano spesso di difficile risoluzione portando a laboriose indagini da parte dei servizi ufficiali e a un incremento dei costi a carico degli organi preposti ai controlli, se di natura dolosa. L'utilizzo pertanto di dispositivi identificativi di tipo elettronici connessi a sistemi di gestione dati informatizzati, porterebbe di certo a minimizzare le pratiche illecite e ridurre o eliminare di fatto quelle discrepanze spesso esistenti tra gli identificativi capi e i registri aziendali. Una lettura univoca mediante bolo endoruminale o trasponder (sistema RFID) permetterebbe l'immissione automatica del capo nel registro informatizzato ad esso connesso limitando cosi inesattezze e garantendo il più alto livello di efficacia in tema di rintracciabilità relativa alla movimentazione, allo stato sanitario e alla sua origine.

2. FRODI

2.1 Frodi Alimentari: Cenni Storici

Contrariamente a quanto si possa pensare, le condotte illecite nel settore alimentare erano già diffuse e radicate anche in ere molto lontane, apparse per lo più in concomitanza delle prime forme di attività commerciale e considerate per questo tra le attività criminali più antiche. In quei tempi, l'uomo era già solito sofisticare gli alimenti appesantendoli mediante l'aggiunta di argilla, gesso o sabbia, colorandoli o profumandoli quando tali proprietà erano indicatori del valore del prodotto. Parallelamente, le autorità Egizia, Greca e Romana avevano già a disposizione delle figure "sanitarie" volte all'ispezione di beni, al controllo, alla prevenzione e alla repressione di tali pratiche che offendessero l'interesse pubblico, talvolta adottando esemplari fenomeni di punizione come nel sistema feudale dell'Europa Medievale, ovvero la morte nel caso degli Egizi (16). Furono essi stessi ad essere precursori delle più moderne tecniche di etichettatura, in quanto erano soliti apporre, ai fini preventivi, dei marchi sulle carni macellate (16). Analoga situazione era riscontrata anche nell'antica Grecia dove la presenza di ispettori sanitari era finalizzata alla prevenzione e repressione delle frodi, principalmente su grano e vino, intervenendo sugli scambi commerciali (16). Dall'addizione di bacche per mascherare la qualità delle birre (Parigi, 1200) (16) alla vendita di burro addizionato di spezie ed erbe per mascherarne il sapore rancido (Parigi, 1400) sino al consumo di liquori aggiunti di acquaragia (Inghilterra, 1700) sono solo alcune delle maggiori frodi che si sono succedute in quel periodo e che resero necessari, per questo, l'emanazione dei primi provvedimenti disciplinari in materia. Il fenomeno assunse proporzioni sempre più vaste intorno al 1800 dando il via ad una escalation di illeciti alimentari favoriti di fatto dalla fase di forte industrializzazione che l'europa stava attraversando: dal vino senza uva al formaggio senza latte; aggiunta di cicoria al caffè, di polvere di marmo allo zucchero e solfato di calce al pane (17) sino a subire un notevole balzo durante il periodo dei Conflitti Mondiali come conseguenza della povertà e della scarsa disponibilità di cibo, stimolando all'uso di materie scadenti o nei casi peggiori l'aggiunta di polvere di gesso alle farine per la produzione del pane. È intorno alla fine del '900 che in Italia viene scoperta la frode

del vino al metanolo; il metanolo veniva infatti addizionato ad elevate dosi al vino per innalzarne il grado alcolico. Tale scandalo portò al decesso di 23 soggetti e a dei gravissimi effetti da intossicazione in altri, quali cecità e danni neurologici (16). Da questo seguì la scoperta dell'uso di anabolizzanti nel settore delle produzioni delle carni allo scopo di aumentarne le performances e ancora, più recentemente, nel 2008 fu scoperto uno tra i più gravi scandali inerente il latte in polvere. Nello specifico questo veniva addizionato di melamina, una sostanza chimica utilizzata nella produzione di plastiche, per mantenere elevato il contenuto proteico del latte diluito. È nel 2013 che lo scandalo della presenza di carne di cavallo (horsegate) in prodotti a base di manzo ha scosso l'intero mercato europeo, in quanto a seguito delle prime segnalazioni (Irlanda e Gran Bretagna), si scoprì in realtà un fenomeno ben più esteso e coinvolgente circa 20 paesi differenti. Tale scandalo destò ancora più clamore e preoccupazione poichè oltre alla sostituzione di specie, l'aspetto ulteriormente allarmante ha riguardato il ritrovamento di tracce di fenilbutazone in detti prodotti, un antidolorifico a uso veterinario, avanzando l'ipotesi che tali carni potessero provenire dal settore sportivo e dunque macellati in clandestinità e introdotti illecitamente nella filiera. In tale settore, una frode di simile natura, oltre all'aspetto della sostituzione di specie ai fini commerciali, tiene conto anche del possibile pericolo di salute del consumatore se questi fosse intollerante al farmaco, alla specie sostituita o ancora problemi etico/religiosi relativi al consumo di talune carni. Oggi pertanto le frodi sono sempre più vaste e sempre più ingegnose, al passo con i tempi e con le tecnlogie, dove l'esigenza del consumatore può, in taluni casi, stimolare inconsapevolmente l'atto illecito in quanto un prodotto potrebbe presentarsi differentemente dall'immaginario collettivo (tranci di tonno trattati con monossido di carbonio per conferire una colorazione rosso vivo, più apprezzato del naturale rosso cupo di tali carni).

2.2 Frodi Alimentari: Definizione

Le frode alimentari rappresentano oggi uno dei problemi più allarmanti inerenti il settore produttivo e la colletività in quanto determinanti di un danno diretto al consumatore e di

ripercussioni economiche trasversali dirette alla vendita di quella specifica tipologia di prodotto oggetto della frode cui ne deriva un effetto di risonanza verso l'intera categoria.

Ad oggi non esiste una espressione ufficiale del termine frode alimentare e definizioni svariate e frammentarie sono state fornite dalle differenti autorità del settore, tra le quali Food and Drug Administration (FDA) e Food Standards Agency (FSA). Più in dettaglio, tale espressione raccoglie un significato ben più ampio di quello fornito dalla stessa FDA sulle cosiddette EMA, Economically Motivated Adulteration o del semplice concetto di contraffazione. Sebbene infatti le maggiori motivazioni che spingono alla frode alimentare rientrino nella sfera economica, gli effetti sono sicuramente riconducibili all'intero settore della sicurezza alimentare e della sanità pubblica, rendendo obbligatoria dunque una precisazione del termine. Tra le definizioni che meglio esplicita tale concetto, rientra quella fornita da Spink & Moyer (14), ovvero quel termine collettivo utilizzato per designare la sostituzione, l'aggiunta, la manomissione o la presentazione ingannevole, in maniera deliberata e intenzionale, di alimenti, ingredienti alimentari o confezioni di alimenti; oppure dichiarazioni false o fuorvianti in merito a un prodotto allo scopo di realizzare profitti economici. Più genericamente, col termine frode alimentare si indica anche la produzione, detenzione, vendita o somministrazione di alimenti non conformi alle disposizioni legislative vigenti (15). Da entrambe le definizioni emergono quindi le principali caratteristiche che una frode alimentare possiede, ovvero la non conformità qualitativo merceologica e/o sanitaria del prodotto con la normativa vigente congiuntamente all'intenzionalità dell'atto e induzione del profilo dell'inganno nel consumatore, finalizzato a un vantaggio economico di un altro soggetto. L'impiego di un approccio di tipo tradizionale alla prevenzione o individuazione di una frode alimentare potrebbe non essere efficiente, in quanto la condotta illecita è basata su differenti motivazioni e fondata quindi su criteri diversi dell'attuale sistema di miglioramento e di protezione della sicurezza e della qualità alimentare. Ne sono un esempio tutti quei casi in cui la frode risulta essere più pericolosa del "classico" rischio alimentare in quanto l'uso di taluni adulteranti non convenzionali non è determinato per cui nessun piano di identificazione esiste ed è interessato dalla ricerca di tali sostanze. Un buon sistema di prevenzione della frode quindi deve prevedere una profonda comprensione delle radici della frode in sè congiuntamente ad una piena cognizione del rischio per la salute

pubblica basato su interventi ed esperienze al fine di adottare le dovute contromisure e minimizzare cosi il rischio. Attualmente sono identificati 3 diversi tipi di rischio per il consumatore a seguito di frode alimentare: diretto, indiretto e tecnico (14). Il rischio diretto si concretizza quando il consumatore è esposto ad un rischio immediato a seguito di una esposizione, dovuto per esempio all'ingestione di un tossico o un contaminante; quello indiretto riguarda l'esposizione a lungo termine verso una data sostanza mediante l'ingestione in piccole dosi ; infine, il rischio tecnico è puramente di natura informativa e si attua quando intenzionalmente, ad esempio, informazioni in merito all'origine di un prodotto sono deliberatamente falsificate.

2.3 Natura delle Frodi Alimentari

La frode, più in senso generico, può essere definite come un "raggiro diretto ad ingannare qualcuno sorprendendone la buona fede" (18). Come già definito, nel settore alimentare, la condotta dolosa è volta ad ingannare la buona fede del consumatore ledendone i suoi diritti e/o incidendo sulla sua salute. Ciononostante, non tutte le condotte illecite in tal senso costituiscono un pericolo per la salute della collettività (ad esempio la differente provenienza di un prodotto da quanto dichiarato) ma ad essa ne arrecano di certo un danno. Si rende quindi necessario la suddivisione delle frodi alimentari e, precisamente, la loro classificazione sulla base della qualità del prodotto alimentare e della sua commercializzazione e sulla base degli effetti dell'illecito sul consumatore.
Sono pertanto distinte in:

Frodi Sanitarie. Tali tipi di frode consistono nel ledere i diritti legali del consumatore relativamente all'aspetto economico e/o alla salubrità di una sostanza, attentando di fatto alla sua salute mediante commercializzazione o somministrazione di tale prodotto (19) (Art. 32 Costituzione - Tutela della Salute Pubblica). Vengono poste in essere da "*chiunque detiene per il commercio o pone in commercio o distribuisce per il consumo acque, sostanze o cose da altri avvelenate, adulterate o contraffate in modo pericoloso per la salute pubblica*". Vale a dire che il reato di frode si configura anche con la sola detenzione o esposizione del prodotto nocivo, anche se di fatto non venduto al

consumatore. Tali frodi si caratterizzano inoltre per la nocività, ovvero l'indubbia e incontrovertibile capacità di provocare danni alla salute umana e per la pericolosità, cioè l'idoneità di una sostanza atta a provocare danni alla salute umana senza però che vi sia documentata corrispondenza.

Frodi Commerciali. Questa categoria di frodi alimentari ledono invece i diritti contrattuali e patrimoniali del consumatore. Nel dettaglio, si verificano quando chi, durante l'esercizio dell'attività commerciale, *consegna all'acquirente una cosa per un'altra o diversa da quella dichiarata o pattuita per origine, provenienza, qualità o quantità* (Art. 515 Codice Penale - Tutela della buona fede del consumatore). La principale differenza con le frodi sanitarie consiste dunque nella vendita di un prodotto che di per sè, non necessariamente costituisce un rischio concreto per i consumatori, ma ai danni di essi l'autore ne realizza un illecito profitto mediante l'atto dell'inganno (impiego di prodotti surgelati senza specifica dichiarazione; vendita per tara merce).

Ulteriormente, come gia accennato, le frodi alimentari possono essere classificate sulla base della composizione del prodotto e/o sugli aspetti esteriori. Vengono pertanto distinte in *frodi sulla qualità intrinseca del prodotto* e *frodi in commercio.*

Al primo gruppo appartengono:

Alterazioni (Art. 5 Legge 283/62). Sono quelle modifiche a carico di un prodotto inerenti la sua composizione e/o le sue caratteristiche organolettiche determinate da fenomeni degenerativi spontanei (es. prolungata conservazione). Costituiscono un esempio di alterazioni di un prodotto, la vendita di vino inacidito, la modifica della data di scadenza o il risanamento di prodotti già deteriorati.

Adulterazioni (CP artt. 440, 442). Riguardano tutte quelle modifiche, volontarie e non dichiarate, della naturale composizione di un prodotto dovute a sottrazione di alcune componenti o ad aggiunta di altre (di scarso valore) per aumentarne il quantitativo ai fini economici, senza però apportarne modifiche apprezzabili. Esempi di adulterazione di alimenti sono l'aggiunta di acqua al latte (diluizione), metanolo al vino o la vendita di mortadella confezionata con carne suina e bovina e venduta come mortadella di puro suino. Alcuni di questi tipi di frode potrebbero esporre i consumatori ad un rischio concreto per la salute nel caso essi siano allergici alla componente aggiunta. È stimato

oggi che più del 90% delle adulterazioni nel settore alimentare sono imputabili alla sostituzione seguita dalla diluizione (Figura 1).

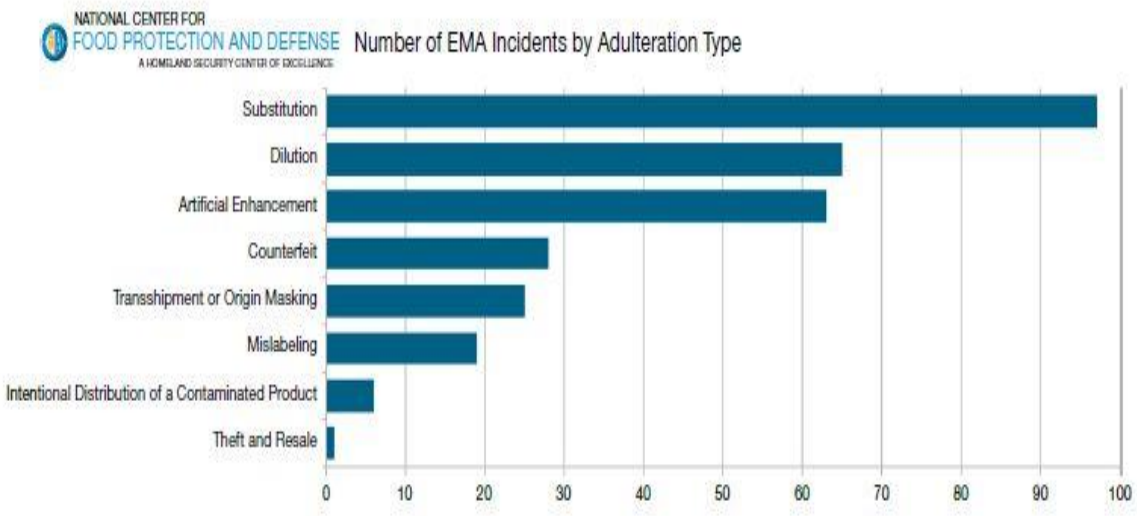


Figura 1. Stima del numero di Economically Motivated Adulteration (EMA). NCFPD EMA Incidents Database; http://www.foodfraudresources.com/tools

Sofisticazioni (CP Art. 515; Art. 5 Legge 283/62). Consistono nella modificazione fraudolenta della naturale composizione di un prodotto dovuta all'aggiunta di sostanze estranee, alla sostituzione di elementi analitici del prodotto con sostanze di qualità inferiore o non consentite. Sono sofisticazioni quelle operazioni in cui il prodotto alimentare viene reso più "attraente" al consumatore mediante l'aggiunta di talune sostanze per migliorane l'aspetto o coprirne i difetti quali ad esempio l'aggiunta di solfiti per ravvivare il colore della carne o aggiunta di coloranti alla pasta per simularne la pasta all'uovo o amido e conservanti agli insaccati.

Al secondo gruppo appartengono:

Falsificazioni. Tali pratiche consistono nella sostituzione completa di un alimento per un altro. Esempi ne sono le frodi di sostituzione *aliud pro alio* in cui una specie pregiata è sostituita con una simile ma di minore valore economico o la sostituzione del burro con margarina.

Contraffazioni (CP Artt. 440, 442). Consiste nel conferire ad un prodotto alimentare delle caratteristiche e dunque una denominazione di vendita, diverse dalla sua reale

composizione e quindi facendolo spesso apparire come un prodotto di maggiore pregio. La contraffazione, data la sua definizione, viene ricondotta alla adulterazione e alla sofisticazione. Sono esempi di contraffazione l'uso di marchi di prodotti alimentari noti, la vendita di un prodotto scongelato per fresco, o la vendita di salame di fegato che non lo contiene tra i suoi ingredienti.

2.4 Tipi di Frodi Alimentari

I fattori promuoventi l'atto della frode alimentare sono numerosi e dipendenti fondamentalmente dal settore commerciale di riferimento. Gli illeciti, ad oggi registrati, sono per lo più riconducibili alle false dichiarazioni in merito alla provenienza, alla qualità, alla composizione ed alle caratteristiche di un prodotto alimentare oltre che alla mancata corrispondenza degli ingredienti dichiarati in etichetta e alla manipolazione della data di scadenza del prodotto stesso. Ovviamente dietro l'atteggiamento ingannevole vi sono delle ragioni in primis di natura economica per il frodatore, spinto molto spesso dal desiderio di profitto, il quale necessita però di un terreno fertile affinchè la frode alimentare possa avere successo. I fattori favorenti questo tipo di condotta sono riconducibili i) alla globalizzazione dei mercati, soprattutto extra UE, le quali danno adito all'ingresso fraudolento di merci spesso non convenzionali, ii) l'aumento del consumo di prodotti di origine animale con il conseguente incremento della richiesta di tali prodotti e invertendo di fatto una tendenza storica al consumo di farinacei (Figura 2), iii) affinamento delle conoscenze scientifiche del settore che di fatto hanno consentito l'impiego di tecnologie ad hoc per mascherare e/o conferire alcune caratteristiche e aspetti ai prodotti alimentari.

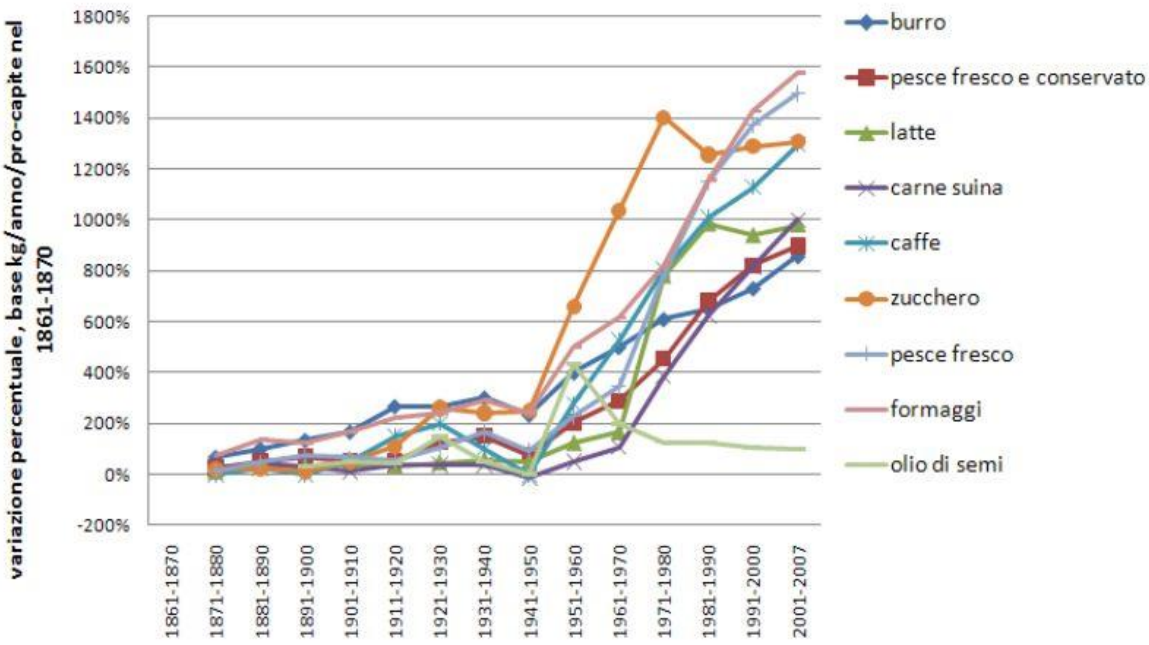


Figura 2. Tendenza degli ultimi 50 anni relativa all'incremento dei consumi di prodotti di origine animale. Elaborazione a cura di INRAN (2011) su dati ISTAT e FAO.

Tra le frodi alimentari più diffuse (Figura 3) rientrano quelle a carico dei i) prodotti della pesca, principalmente inerenti la sostituzione di specie e l'addizione di additivi e ingredienti per modificarne le proprietà, ii) dei prodotti del settore lattiero-caseario, e principalmente l'aggiunta di alcali al latte inacidito o di perossido di idrogeno per ridurne la carica batterica, cosi come formaggi ottenuti da latte in polvere ricostituito o designati DOP impropriamente, iii) e quelli inerenti il settore delle produzioni carnee. In questo settore sono da annoverare:

-Carni addizionate di sostanze non consentite, quali ormoni e farmaci (beta agonisti), o di altre componenti in concentrazioni maggiori di quelle previste dalla normativa ai fini dell'ingrassamento.

- Carni appartenenti a categorie diverse rispetto a quanto dichiarato, quale la vendita di castrato o ovino adulto per agnello, oppure la vendita di tagli anatomici per altri di maggiore pregio, quali girello per filetto.

-Carni di specie diverse da quelle dichiarate e/o insaccati dichiarati prodotti con carni di sola specie suina e contenenti carni di più specie animali meno costose (pollo e/o tacchino).

-Carni trattate con additivi quali monossido di carbonio e/o solfiti e nitriti per mascherarne uno stato di alterazione e ravvivarne la colorazione.

-Prodotti generici a base di carne e commercializzati a marchio DOP (prosciutto di Parma)

-Carni macinate aggiunte di tessuti estranei e di scarto e spesso di specie diverse, quali frattaglie spesso destinate all'alimentazione animale e ridestinate illecitamente all'alimentazione umana.

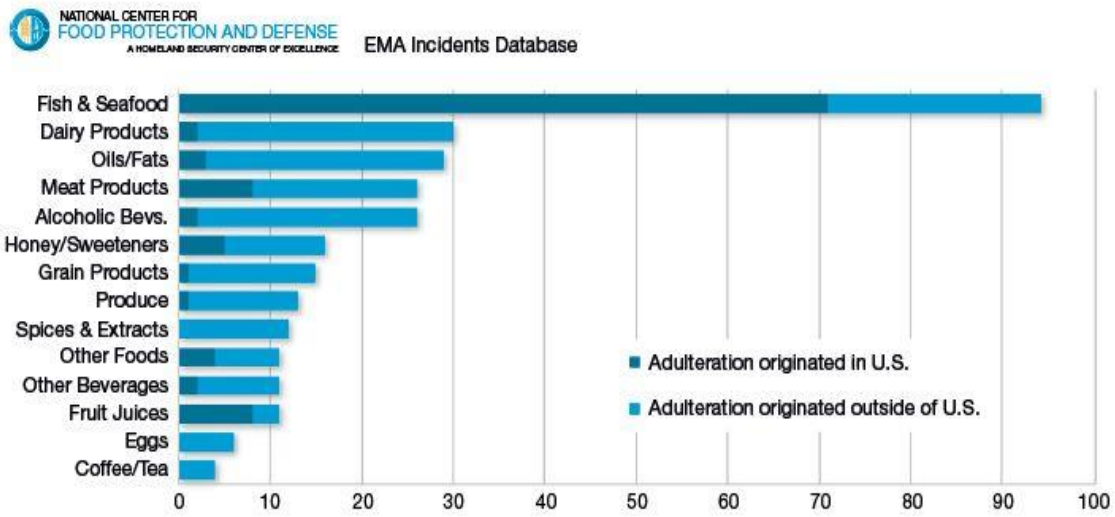


Figura 3. Frequenza dei maggiori eventi di adulterazione (Economically Motivated Adulteration- EMA) negli Stati Uniti e al di fuori. NCFPD EMA Incidents Database; http://www.foodfraudresources.com/tools.

Costituiscono ulteriormente casi di frode del settore carni, il trattamento in bagni speciali allo scopo di far loro assorbire una maggiore quantità di acqua in modo da appesantirle alla vendita (carni idratate) o ancora l'aggiunta alle carni macinate di eccessive quantità di grasso e connettivo a discapito del tessuto muscolare.

3. IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

3.1 Evoluzione delle metodiche identificative

L'identificazione di specie di un prodotto alimentare rappresenta oggi uno dei maggiori problemi da affrontare per gli operatori del settore, i quali utilizzano le proprie competenze in materia basandosi esclusivamente sul riconoscimento di caratteri puramente morfologici. Questo pone sicuramente delle limitazioni all'identificazione stessa derivante da un'incertezza nel riconoscimento soprattutto quando la specie in questione perde quei caratteri distintivi identificativi e, dunque, imbattersi in errori da incorretta assegnazione diventa piuttosto probabile. È per tale motivo che, quando un alimento, a seguito del suo processo lavorativo o trasformativo, perde di elementi sufficienti alla corretta indicazione di specie si ricorre all'impiego di tecniche analitiche.

Sin dagli anni '80 numerose tecniche hanno trovato impiego nel settore e altre, a tal proposito, si sono sviluppate, mirando principalmente alla messa in evidenza di quelle caratteristiche discriminative esistenti tra le specie e, basate in prima battuta, sull'analisi della componente proteica caratterizzante la specie. L'impiego di tecniche quali IEF (isoelectrofocusing) delle caseine, HPLC (high-performance liquid chromatography) (20) ed elettroforesi proteica sono solo alcune delle metodiche identificative applicate. Tali tecniche hanno sicuramente rappresentato il punto di partenza e al contempo di svolta del settore identificativo animale sebbene a volte poco specifici e di applicazione limitata alla sola categoria degli alimenti freschi o che comunque non abbiano subito dei trattamenti tali da comprometterne l'integrita proteica e, per tali motivi, abbandonate. Alcune di esse cedettero successivamente il passo a tecniche le quali permettessero l'analisi proteica anche su alimenti trattati al calore, ad eccezione di quelli sottoposti a trattamenti di riscaldamento estremi, quale la sterilizzazione: fù cosi la volta dell'impiego della SDS-PAGE e l'Isoelettrofocusing con Urea. Ancora, l'impiego della tecnica ELISA si rilevò particolarmente utile per le conserve a base di carne (21), evidenziando però delle limitazioni nella identificazione di specie filogeneticamente molto vicine tra loro e ponendo altresì non poche difficoltà allo sviluppo di anticorpi specifici per epitopi caratteristici della specie in questione. È negli ultimi anni, con l'avvento delle moderne

biotecnologie e l'introduzione delle tecniche di biologia molecolare applicate alla genetica del *food authenticity*, che il settore alimentare subisce un enorme balzo in avanti, tracciando di fatto un punto di svolta nella rintracciabilità del prodotto alimentare e nell'identificazione di specie negli alimenti di origine animale. Tali tecniche rappresentano oggi il gold standard del settore, in quanto dotate di maggiore specificità, sensibilità e accuratezza se comparate alle metodiche di identificazione su base proteica, oltre che essere affidabili e ripetibili per quanto concerne gli alimenti trasformati, di complessa composizione e trattati in genere in maniera estrema (cottura, pastorizzazione, sterilizzazione) a causa della termostabilità dell'acido nucleico (22). Dall'introduzione dunque negli anni '90 della reazione a catena della polimerasi (PCR), si sono susseguite una serie di metodiche identificative cosiddette PCR-based, focalizzate su marker identificativi differenti per grado di variabilità o polimorfismo, per attendibilità e standardizzazione. Grazie dunque all'enorme vantaggio della tecnica di PCR, ovvero la sua versatilità e combinabilità con diverse tecniche molecolari, se non preliminare, sono, ad oggi, quindi impiegate tecnologie identificative come:

-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (23), la quale sfrutta la presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) sulla sequenza bersaglio che creeranno di nuovi o elimineranno dei siti di restrizione dalla sequenza stessa; mediante successiva digestione enzimatica di tale sequenza e separazione su gel di elettroforesi, è possibile la visualizzazione di un pattern di frammenti specifico per la specie.

-RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) (24), rappresenta una variante della classica PCR in cui però i segmenti di DNA da amplificare sono random e quindi amplificati mediante delle corte e arbitrarie coppie di primer; la reazione creerà uno specifico pattern in grado di generare un profilo genetico semi-unico.

-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (25), sfrutta la digestione del DNA su siti di restrizione noti e la successiva ligazione di adattatori/linker ai frammenti digeriti. Un subset di tali frammenti viene dapprima pre-amplificato e poi selettivamente amplificato mediante impiego di primer complementari agli adattatori stessi; i frammenti sono poi risolti su un gel di poliacrilammide o mediante elettroforesi capillare, i quali forniscono dei dati di presenza o assenza del polimorfismo.

Tali metodiche, sebbene ampliamente applicate e informative, possono trovare comunque delle limitazioni alla identificazione di specie a causa degli elevati costi di realizzazione e dei tempi di esecuzione (26). Tra queste, la tecnica RFLP rappresenta il migliore compromesso per potere identificativo, ripetibilità e applicabilità del metodo comparato ai costi e alle modalità di esecuzione degli altri metodi, oltre che essere una valida alternativa al sequenziamento di specifiche porzioni del genoma, sebbene meno informativa di quest'ultimo. A causa quindi delle sue potenzialità e del suo grado di informazione, il DNA rappresenta pertanto la molecola di elezione per lo sviluppo di saggi molecolari, tanto nel sistema veterinario per le prove di identificazione di specie che in quello umano.

3.2 DNA Barcoding

Il DNA barcoding è una metodica molecolare identificativa e tassonomica che sfrutta la variabilità del genoma di un organismo per l'identificazione biologica come appartenente ad un individuo o ad una specie (27). Questa tecnica pone le sue basi sul fondamento biologico che ogni specie possiede un unico codice identificativo di DNA, metaforicamente paragonato ad un codice a barre, e dunque, come evento probabilistico, attribuibile in maniera univoca ad una specie anche se filogeneticamente molto vicina ad un'altra (Figura 4).

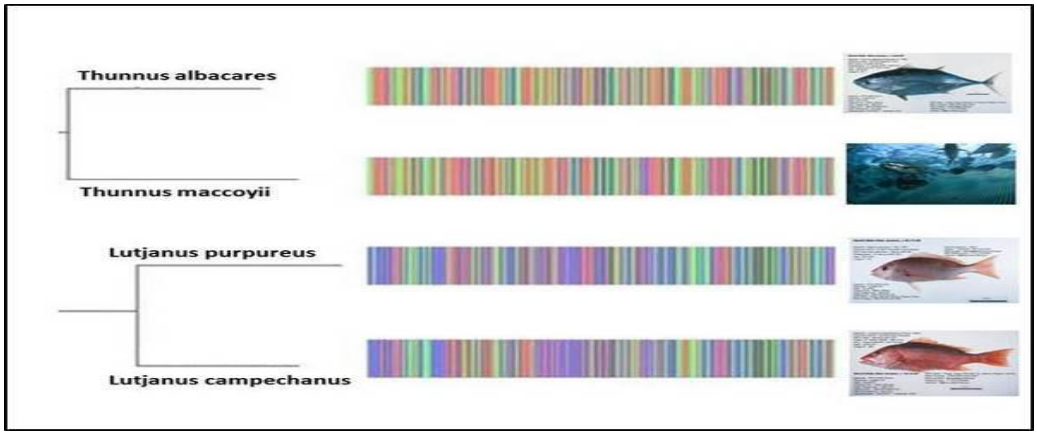


Figura 4. DNA Barcoding. Rappresentazione schematica delle differenze di barcode esistenti tra coppie di specie di pesci filogeneticamente molto vicini.

Nell'ultimo decennio, la metodica del DNA barcoding, impiegata primariamente nel settore filogenetico e tassonomico, ha subìto una estensione della sua applicazione in campo veterinario, proponendolo come tool di elezione e affiancando e introducendo nuove metodologie alla identificazione genetica. Tale passaggio è stato essenzialmente segnato dai diversi scandali alimentari susseguitisi negli anni che hanno condotto oggi ad un maggiore interesse e attenzione del consumatore verso la sicurezza e autenticità del prodotto alimentare, principalmente quelli di origine animale, e alla crescente esigenza di risposte in tal senso. Il DNA Barcoding, da questo punto di vista, rappresenta dunque la risposta a tali esigenze diventando sinonimo di sicurezza e qualità, in quanto utile ed efficace allo scopo, abile nel scoraggiare e indivduare la frode. È oltretutto considerato utile all'implementazione di un sistema di tracciabilità di filiera in quanto basato sulla identificazione della specie animale e dei suoi prodotti mediante l'analisi di specifiche regioni di DNA extra nucleari (marcatori) altamente polimorfiche, inalterabili durante la vita e soprattutto stabili ai diversi trattamenti trasformativi cui sono sottoposti i prodotti alimentari, ma non per questo non degradabili. Da un punto di vista tecnico, la metodica essenzialmente prevede l'amplificazione single-locus per PCR di corte regioni di DNA mitocondriale (400-700 bp) altamente polimorfiche che risultano conservate a livello di specie e al contempo sufficientemente variabili all'interno della medesima specie e tra le specie. Nello specifico, un polimorfismo a singolo nucleotide, detto SNPs, è una variazione nucleotidica, spesso biallelica, che ricorre in individui della stesse specie e che può essere utilizzata per caratterizzare quella stessa specie. L'approccio si basa quindi sull'analisi della sequenze nucleotidica di tali regioni mitocondriali in termini di SNPs e Ins/Del (Inserzioni e Delezioni di sequenza) e sul loro raffronto con delle sequenze di riferimento ortologhe disponibili su database pubblici, quali BOLD e GenBank, in grado di fornire un risultato espresso come grado probabilistico di attribuzione ad uno specifico aplotipo di specie. La rivoluzione introdotta da tale metodica risiede da un lato nel suo elevato potere discriminativo, ma anche nella sua coniugazione tra la standardizzazione del metodo con le moderne tecnologie elettroniche e digitali. La sua applicazione è difatti realizzabile in quanto strettamente dipendente dall'associazione esistente tra le sequenze di barcode e quelle di riferimento esistenti oggi nelle banche dati, continuamente aggiunte di informazioni inerenti le sequenze genetiche di riferimento. Tali database rappresentano

una eccellente fonte di materiale genetico (circa 108 milioni di sequenze depositate) utilizzabili per comparazioni, allineamenti e progettazioni di nuovi sistemi identificativi, ma sono essi stessi il loro principale limite all'identificazione di specie, in quanto non privi di errori a causa del mancato controllo sulle informazioni inserite. Ciononostante, inaccuratezze di tale tipo sono evidenziabili solo per alcune specie rare, poco conosciute o, in relazione al settore alimentare, non utilizzate per la manipolazione fraudolenta alimentare e riguardante per lo più specie batteriche; ampie informazioni ad elevato grado di affidabilità sono invece disponibili per le specie più comuni oggetto di frode del comparto alimentare. È pertanto che il DNA barcoding rappresenta un eccezionale tool a garanzia della tracciabilità alimentare in grado di minimizzare e contrastare il fenomeno delle frodi del settore valorizzando quindi le produzioni locali e salvaguardando la salute pubblica. Affinchè però un sistema di Barcoding sia però efficace deve basarsi sull'impiego di alcuni marcatori molecolari che necessariamente posseggano delle caratteristiche e rispondano a determinati requisiti che li rendano idonei al tipo di informazione desiderata (28). Innanzitutto, un marcatore di questo tipo deve essere dotato di un ampia copertura identificativa, vale a dire la possibilità di rintracciare quel marcatore molecolare nel più ampio range di specie e che da esse sia condiviso in maniera universale di modo da rendere la metodica applicabile su larga scala. Un sistema di tale tipo deve essere inoltre dotato di alta capacità risolutiva, in grado di discriminare le specie sulla base di differenze genetiche interspecifiche del marcatore e, ancora di più, quelle intraspecifiche e, quindi, da affiancare all'universalità dello stesso marcatore molecolare scelto come barcode. In ultimo, deve contenere delle regioni nucleotidiche conservate e costanti fiancheggianti quelle variabili affinchè rappresentino il substrato nucleotidico sul quale improntare il saggio molecolare. Per tali motivi, uno dei fattori critici per l'identificazione di specie e per il suo successo è l'accuratezza e la forza del marcatore scelto, i quali dipendono per l'appunto dal fatto che la variazione interspecifica dovrebbe eccedere quella intraspecifica di una threshold di circa 10 volte (29) (divergence threshold) rendendolo pertanto utile all'identificazione di una specie con un margine di errore trascurabile. Secondo infatti Meyer & Pauly (2005) (30), la variabilità di specie sulla base delle caratteristiche di un marcatore molecolare deve rispecchiare tali variazioni in modo che il gap esistente tra le due variabili sia massimizzato (Barcoding

gap) a discapito di marcatori che presentano variabilità significativamente sovrapponibili (overlapping) che ne compromettono l'utilità della metodica (Figura 5). Occorre però definire che il valore di divergenza medio tra le specie è stimato a cira >3%, per cui l'utilizzo di tale soglia di limite (10-fold rule) rende questo modello applicabile solo in parte, in quanto risolutivo per alcune specie e non per altre. In forza a tale concetto, l'assenza di una validazione biologica, evidenzia delle eccezioni al modello del barcoding gap, particolarmente attraverso la presenza di falsi positivi o negativi, come nel caso in cui le popolazioni di una stessa specie siano sufficientemente distinti geneticamente a causa di barriere geografiche esistenti o quando minime o nessuna variazione nucleotidica viene riscontrata nel frammento utilizzato ai fini del barcode tra le specie in esame (falso negativo) (es. popolazioni isolate riproduttivamente). In tali casi, l'utilizzo di tale metodica si rivelerebbe poco discriminativa o nulla e, l'applicazione di altri sistemi PCR-based, si rivelerebbe più idonea al caso (31). Il DNA barcoding dunque sebbene di grande ausilio, non rappresenta la metodica perfetta, ma ha sicuramente impattato profondamente il settore diventando uno tra gli approcci molecolari all'identificazione di specie più utilizzato, il quale necessita però di una conoscenza critica per una sua più corretta applicazione.

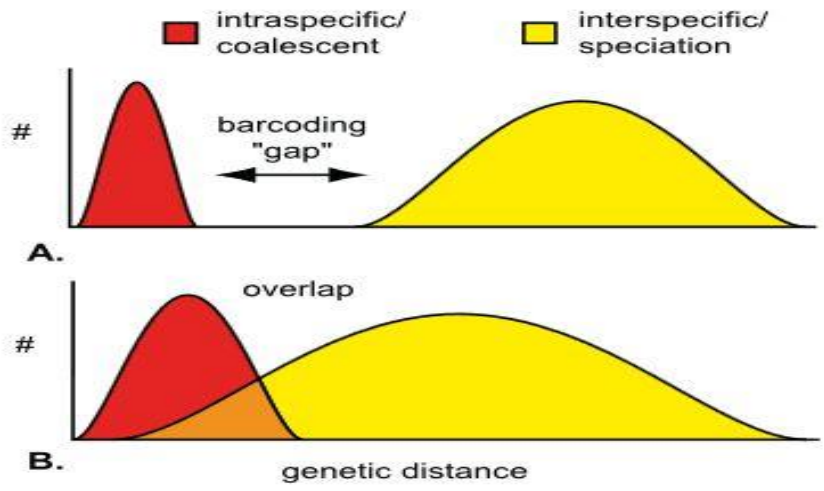


Figura 5. Distribuzione schematica del Barcoding gap. A. Situazione ideale con massimizzazione del gap senza overlap; B. Modello alternativo con significativo overlap e senza Barcoding gap.

3.2.1 DNA Mitocondriale (mtDNA)

I mitocondri sono organelli citoplasmatici contenuti nelle cellule eucariotiche (800-2000/cellula) caratterizzati da un alto grado di autonomia genetica e metabolica in quanto deputati alla produzione di energia mediante fosforilazione ossidativa. Sono dotati di un proprio acido nucleico, chiamato mtDNA (DNA mitocondriale), strutturato in maniera circolare e a doppio filamento, separato dal nucleo e racchiuso nella matrice mitocondriale. In particolare, diversamente dal DNA nucleare, tale molecola è presente ad elevato numero di copie per mitocondrio e quindi ad elevata presenza nella cellula (>1000 copie/cellula), manca di introni, possiede un basso tasso di ricombinazione ed elevato tasso di mutazione oltre che assenza di crossingover ed essere ereditato attraverso la linea materna. Il genoma risulta superavvolto, ha una lunghezza complessiva variabile da 15 Kb a circa 16,6 Kb fortemente conservata nel mondo animale ed è costituito, come detto, da un doppio filamento di due catene denominate H (heavy strand) ed L (light strand) (Figura 6). Le catene si differenziano sulla base della loro composizione nucleotidica in residui GC e per la presenza sul filmento H delle maggiori informazioni codificanti.

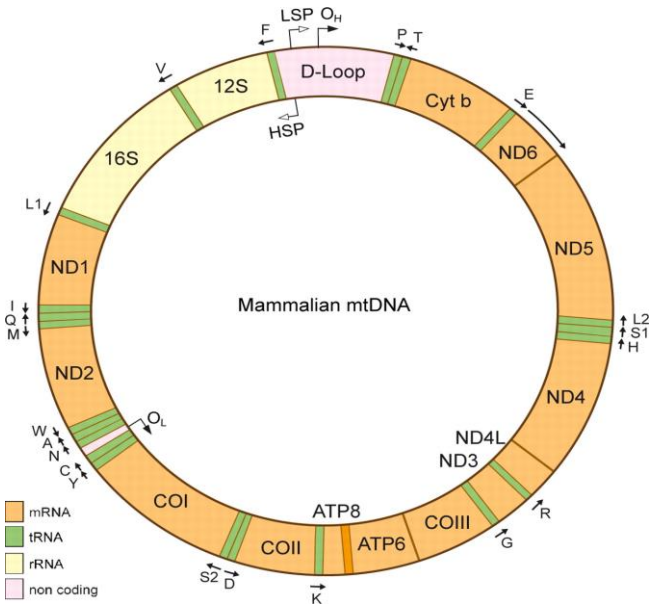


Figura 6. Distribuzione schematica del mtDNA di mammifero.

In particolare le sequenze genetiche per la codifica di 2 rRNAs (RNA ribosomiali 12S e 16S, rRNA), 14tRNAs (RNA transfer) e 12 polipeptidi risiedono sul filmento heavy. La controparte possiede l'informazione genetica per 8 tRNA e 1 solo polipeptide. I geni codificati da questa molecola sono unici a differenza del genoma nucleare ma, di contro, l'elevato numero di mitocondri associato all'elevato numero di copie del genoma, rende questo tipo di DNA altamente ripetitivo, aumentando di fatto la probabilità di ricercare molecole stampo anche in presenza di DNA degradato. Infatti, nonostante rappresenti solo 1/200.000 della controparte nucleare, tale acido nucleico costituisce circa lo 0.5% del genoma grazie all'elevato numero di mitocondri presenti nella cellula. I due filamenti sono replicati a partire da origini di replicazione (ORI) differenti. Inizialmente la sintesi ha luogo dapprima sulla catena L, a partire da una regione prossima all'estremità 5' del gene per l'rRNA 12S, al livello del quale l'origine di replicazione è costituita da un singolo "repeat" invertito che forma una apertura che tiene separati i due filamenti H ed L. La sintesi si sposta successivamente sulla catena H, nella regione del D-loop (displacement loop) costituito da circa 1000 bp, a partire dalla quale inizia anche la trascrizione dei geni, precisamente nella regione non codificante adiacente al D-loop stesso e da promotori distinti per le due catene, HSP (heavy strand promoter) e LSP (light strand promoter). La regione del D-loop è costituita da un dominio centrale caratterizzato da elevata similarità nucleotidica tra le specie e fiancheggiato da domini periferici variabili in composizione e lunghezza e che sono spesso caratteristici, fonte di eterogeneità e dunque informativi della specie (32). Il tasso di evoluzione del genoma mitocondriale è relativamente veloce, circa 10 volte maggiore del DNA nucleare (33), il che lo rende suscettibile all'accumulo di variazioni nucleotidiche anche in tempi relativamente brevi e per specie filogeneticamente vicine, stimando un tasso del 2% per milione di anni per i primati. Non sono ben chiare le ragioni per le quali tale molecola sia cosi soggetta a pressione evolutiva, probabilmente la causa di ciò è da ricercare nelle stesse caratteristiche del mtDNA. Essendo non costituito da istoni o a causa della bassa fedeltà di replicazione della DNA polimerasi o ancora la suscettibilità a danni da ROS (specie reattive dell'ossigeno) prodotti dalla catena respiratoria ed esasperati dall'assenza di sistemi di riparo (34) o ancora perché, dato il tempo di replicazione piuttosto lungo, le due catene permangono per un lungo tempo in uno stato di singola elica, ne consegue

comunque una versatilità tale da rendere questa molecola particolarmente “instabile” e conforme alle caratteristiche ricercate per le analisi molecolari. Inoltre, la sua conformazione di doppia elica circolare chiusa, unitamente alla sua composizione in basi, la dotano di una grande resistenza alla denaturazione, rendendola quindi particolarmente adatta all’analisi di matrici alimentari sottoposte a trattamenti termici spinti. È proprio grazie alle caratteristiche appena descritte che tale molecola rappresenta l’acido nucleico di elezione per scopi legati all’identificazione genetica di specie, tanto nella tecnica del barcoding che in altre. Tra i marcatori molecolari che meglio si prestano a scopi identificativi, tra i geni mitocondriali, sono quelli rappresentati dalle 3 subunità della citocromo ossidasi C (COI, COII, COIII) (35), dal Citocromo b (Cyt B) (36), dall’rRNA 16S (37) e da alcuni tRNA (38). Sono anche da considerare utili a tali fini identificativi i geni che codificano per la regione variabile del D-loop, per il rRNA 12S (39) e per la NADH 1 (40). Tra questi marcatori, la regione genetica di maggiore interesse e più oggetto di studio per le caratteristiche sopra descritte è rappresentata dalla subunità I della citocoromo ossidasi (COI). Si tratta di una proteina mitocondriale transmembrana coinvolta nella fosforilazione ossidativa la quale mostra un grado di conservazione tra le specie stimata al <10%, con una variazione genetica intraspecifica minore della interspecifica, rendendolo di fatto un ottimo candidato alla caratterizzazione genetica e per la quale un frammento standard di 658 bp è stato validato ai fini identificativi (27). Tale sequenza possiede un tasso di mutazione lento tale che le variazioni all’interno della specie siano minimizzate e al contempo elevato tale da mettere in evidenza quelle variazioni interspecifiche. Sebbene tale marcatore sia però il più utilizzato per scopi identificativi, esso raggiunge elevata efficienza e specificità informativa se caratterizzato mediante sequenziamento genetico o tramite RFLP in un’ampia porzione (500-700 bp) della sua sequenza nucleotidica, in quanto, specie simili o appartanenti alla stesso genere, potrebbero non essere differenziati su un frammento stampo di minore lunghezza. Come è noto, a causa dei trattamenti termici distruttivi cui i prodotti alimentari sono sottoposti durante le fasi produttive, l’identificazione genetica basata sulla caratterizzazione di templati di grandi dimensioni spesso fallisce a causa della degradazione del materiale genetico (41, 42), il quale perde di integrità e, idealmente, la metodologia identificativa dovrebbe essere dunque basata sull’impiego di marcatori idonei alla loro

caratterizzazione su corti frammenti (100-200 bp), che ne aumentino le chance di amplificazione e diano un certo grado di affidabilità e potere identificativo. La scelta dunque del marcatore da utilizzare risulta estremamente importante in tal senso e dipendente dal grado di sicurezza ricercato.

3.3 PCR end-point

Introdotta negli anni ’80 ha segnato un punto di svolta epocale nelle analisi del DNA rivoluzionando l’intero comparto della genetica molecolare mediante un approccio nuovo e innovativo per lo studio e l’analisi dei geni. La tecnica, dotata di estrema sensibilità e specificità, consente la sintesi enzimatica *in vitro* di segmenti di DNA in maniera esponenziale, amplificando il numero di molecole target di partenza e di fatto riproducendo sintetitcamente quella reazione enzimatica che *in vivo* è la replicazione del DNA. Si tratta di una reazione di tipo ciclica, ripetuta un numero variabile di volte direttamente proporzionale alla quantità di prodotto target ottenuto. Il DNA è sottoposto inizialmente a una fase di denaturazione ad elevate temperature che provoca il cosiddetto melting del DNA, ovvero la distruzione dei legami idrogeno esistenti tra le basi complementari e quindi perdita delle interazioni chimiche e apertura della doppia elica. La temperatura di reazione a questo punto viene abbassata in un range variabile da 50-65°C, in cui viene consentita la fase di appaiamento o annealing dei primer, ovvero la completa ibridazione agli estremi 3’ e 5’ di una coppia di oligonucleotidi sintetici (circa 19-25 basi) sulle regioni fiancheggianti la regione target di DNA a singolo filamento. La temperatura in questa fase gioca un ruolo critico e può essere ottmizzata in modo da ottenere la massima efficienza di appaiamento allo stampo corretto e quindi il minimo legame ad altre sequenze. Questa fase è dunque temperatura dipendente, in quanto la formazione di amplificati aspecifici è riconducibile a temperature di annealing (Ta) basse tali da consentire l’ibridazione anche con regioni del DNA non perfettamente complementari (mismatch). Di contro, Ta elevate porteranno alla non ibridazione del primer con nessuna sequenza in quanto tale temperatura è tale da mantenere la coppia primer-target in uno stato di melting, determinando di fatto una non amplificazione. La temperatura di annealing più idonea dipenderà quindi dalla sequenza scelta per

l'appaiamento e dalla lunghezza del primer stesso, in quanto più residui GC saranno presenti nella sequenza del primer maggiore sarà la forza del suo appaiamento e, di conseguenza, più elevata sarà la Ta da applicare. Per tali motivi, le Ta delle coppie di primer devono essere più simili possibili tra loro (±2°C) e complessivamente dai 3-5°C in meno rispetto alle loro temperature di melting (Tm). Solo in tali casi il complesso primer-DNA target si legherà stabilmente e formerà i legami idrogeno fornendo quindi un 3'-OH libero alla DNA polimerasi per catalizzare la successiva reazione di allungamento. In tale fase enzimatica, l'attività catalitica dell'oloenzima, ottimale intorno ai 72°C e dunque termostabile, sintetizza un nuovo filamento complementare di DNA aggiungendo nucleotidi trifosfati all'estremità 3' dell'ibrido primer-DNA target (innesco). Il tempo di estensione dipenderà dalla grandezza del frammento da amplificare, il quale dipende dalla velocità di incorporazione nucleotidica della polimerasi, mediamente a temperatura ottimale, di circa 1000 nucleotidi per minuto. A questo punto la temperaturà verrà ancora una volta innalzata per iniziare un nuovo ciclo di PCR. Dal primo ciclo si otterrano due molecole di DNA a doppio filamento per ciascuna molecola originaria e, in assenza di condizioni limitanti quali substrati e reagenti, in ciascun ciclo la quantità di DNA verrà raddoppiata, amplificando di fatto in maniera esponenziale il target scelto. Possiamo quindi considerare la PCR composta da tre distinte fasi, le quali caratterizzano la sua cinetica di amplificazione (Figura 7).

-Fase E (Early): Questa fase rappresenta lo step iniziale in cui i primers iniziano a scansionare il templato di DNA alla ricerca della sequenza complementare sulla quale ibridare. Tale fase non risulta di particolare difficoltà dato l'eccesso di oligo aggiunti alla reazione e date le condizioni ottimali alle quali operano gli stessi, nonché la concentrazione di Mg^{2+} e la temperatura. Si forma dunque in questa fase un complesso binario stabile per la successiva interazione con la DNA polimerasi, la quale mostra attività catalitica anche a temperature inferiori rispetto a quella ottimale di estensione (72°C). L'allungamento della catena, infatti, a temperature non ottimali stabilizza ulteriormente il duplex il quale non dissocierà al raggiungimento dei 72°C in quanto, di pari passo con l'estensione, aumenterà la Tm del duplex stesso.

-Fase M (Mid): In questa fase il processo di amplificazione inizia e procede a gran ritmo, idealmente raddoppiando il numero di copie della sequenza target selezionata nella fase

di annealing. Durante questo step si assiste ad un accumulo esponenziale del prodotto in quanto, man mano che la fase di amplificazione procede, il numero di copie di target aumenterà e dunque più semplice sarà rintracciare le sequenze complementari nella miscela da parte dei primers. Sarebbe importante concludere la reazione di PCR durante tale fase e appena prima l'inizio della fase successiva.

-Fase L (late): In tale fase, detta anche di plateau, l'amplificazione diminuisce progressivamente come conseguenza della riduzione dei reagenti disponibili alla reazione. In particolare, questo è dovuto all'esaurimento dei reagenti o alla inibizione della stessa reazione dai prodotti originati i quali tendono a reibridarsi (reannealing) essendo ridotta la quantità di primers disponibili e, poichè gli ampliconi sono di gran lunga maggiori della lunghezza degli oligo, il reanniling dei prodotti inizia già a temperature più elevate per effetto dell'aumento della Tm, sequenstrando di fatto il templato per le successive reazioni e rendendo inconcludente il processo.

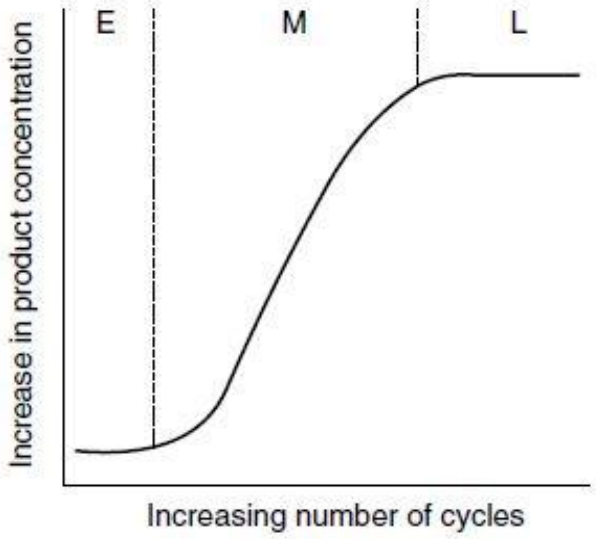


Figura 7. Cinetica di accumulo dell'amplicone in una reazione di PCR. E: Fase precoce; M: Fase esponenziale; L: Fase tardiva o plateau. (McPherson M.J. & Moller S.G., PCR-Second Edition, 2006).

In una reazione di PCR, inoltre, la relazione tra la quantità di DNA bersaglio iniziale (A) e la quantità di prodotto amplificato ottenuto dopo *n* cicli (Yn) in condizioni ideali, è espressa dalla equazione (43): $Yn = A^* (1+E)^n$

dove *E* rappresenta l'efficienza della reazione in ciascun ciclo di PCR. Come già detto, è chiaro che l'efficienza di amplificazione non dipenderà solamente dal numero di molecole di DNA bersaglio presenti inizialmente nella reazione, ma anche da una serie di altre variabili, condizioni per le quali si raggiungerà uno stadio di plateau.

3.4 Real Time PCR

Come gia definito, la PCR rappresenta una delle tecniche più all'avanguardia del settore molecolare, la quale consente l'amplificazione di specifiche sequenze target di DNA milioni di volte mediante l'impiego di opportuni oligo sintetici. La rilevabilità del prodotto amplificato deve necessariamente avvalersi di sistemi di detection i quali sono basati per lo più sull'impiego di gel di elettroforesi o su sistemi di analisi di immagini, i quali consentono una stima della misura delle dimensioni dell'amplicone e non sono in grado di determinare la quantità di target di partenza, bensi la mera presenza o assenza di un prodotto. La reazione di PCR, almeno su base teorica, è caratterizzata da una perfetta efficienza relata al raddoppio delle molecole di DNA dopo ciascun ciclo di PCR rispetto alla quantità di DNA di partenza. In realtà però, la resa effettiva è ben differente da quella teorica in quanto si raggiungerà la cosiddetta fase di plateau a livello del quale non si avrà più un netto incremento di prodotti (44). In una reazione di PCR classica, o end-point, infatti l'amplificazione delle molecole di DNA target procederà solo per un certo numero di cicli prima che vada ad esaurimento e quindi non vi è modo di calcolare la quantità di materiale di partenza in rapporto alla quantità di prodotto ottenuto alla fine della reazione, se non in maniera poco affidabile. Infatti, sono le prime fasi della reazione di PCR a determinare un accumulo apprezzabile del prodotto e mediante misurazione in questa fase di crescita, definita esponenziale, è possibile una correlazione con la quantità di target inziale. La ricerca di una soluzione a tale questione è stata la forza trainante che ha permesso negli anni '90 l'introduzione della Real Time PCR, aprendo di fatto nuove prospettive di approccio della classica metodica di PCR. In una reazione di Real Time PCR, a differenza della end-point, la quantità di prodotto formato è monitorato durante l'intero ciclo di reazione mediante misurazione dell'intensità di fluorescenza emessa da particolari fluorofori che fungono da reporter (45). Questo tipo di approccio, di coniugare

le fasi di amplificazione e detection in una unica reazione, è reso possible dall'utilizzo di particolari molecole chimiche, detti fluorofori, in grado di emettere un segnale di fluorescenza apprezzabile. Tali molecole sono utilizzate in una reazione di amplificazione Real Time come molecole leganti il DNA o come molecole legate covalentemente a oligonucleotidi di ibridazione (rispettivamente intercalanti e probe). In entrambi i casi, il reporter fluorescente emetterà luce visibile solo quando associato con l'amplicone, per cui variazioni nella fluorescenza emessa rappresentano una espressione diretta della quantità di prodotto formato permettendo pertanto di quantificare il numero di molecole di DNA target presenti all'inizio della reazione. Poichè, come detto, l'intensità di fluorescenza del reporter è misurata costantemente durante l'intera reazione, è possible identificare il singolo ciclo di PCR al quale il segnale emesso risulta significativo e correlarlo dunque con la quantità di templato iniziale, mediante opportuni accorgimenti. Durante i primi cicli di reazione, il segnale di fluorescenza è debole e non mostra apprezzabili oscillazioni in quanto il prodotto amplificato è ancora a bassa concentrazione e non puo essere quindi ancora distinto dal segnale di fondo dato dai fluorofori impiegati (background o baseline). Man mano che la reazione procede, il prodotto di amplificazione inizia ad aumentare rapidamente sviluppando un segnale di fluorescenza che inizia a crescere in maniera esponenziale, per poi saturarsi in fase di plateau, seguendo la medesima cinetica descritta per la PCR canonica. Definendo una soglia di fluorescenza (threshold) settata al di sopra del valore di background, quando l'intensità del segnale supera la soglia fissata, tale valore viene registrato come livello di threshold. Il numero di cicli necessari affinchè venga raggiunta tale soglia è detto Ciclo di Threshold o Ct (Figura 8) (46). Conoscendo infatti il valore di Ct e generando una curva di concentrazione di DNA standard a titolo noto plottata su un grafico fluorescenza su numero di cicli, è possible estrapolare la concentrazione di templato iniziale. In altre parole, la quantificazione in una Real Time

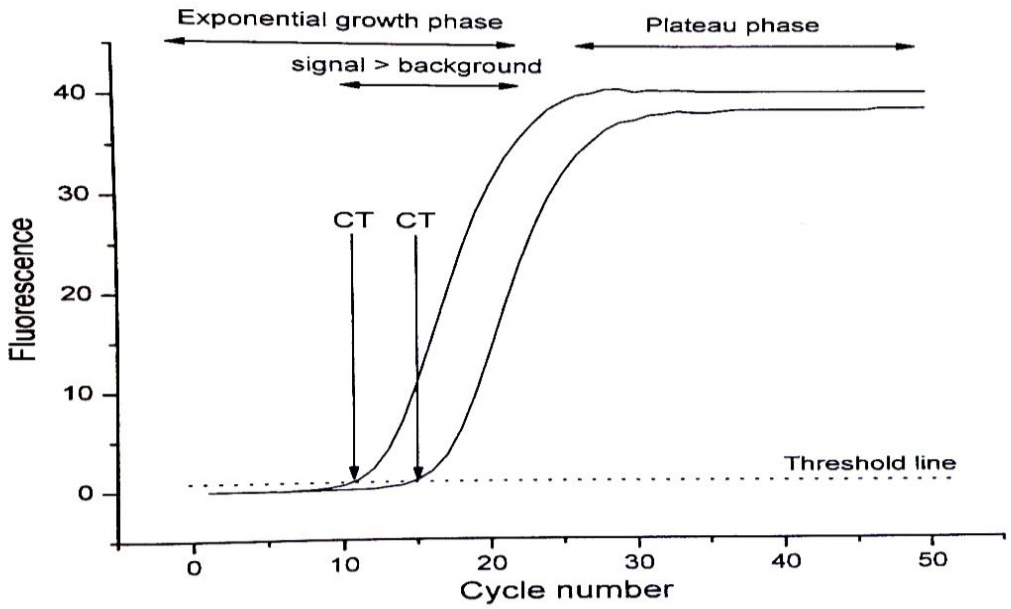


Figura 8. Rappresentazione schematica dell'andamento esponenziale di una tipica reazione di Real Time PCR. Ct: Ciclo di threshold;

PCR è effettuata misurando il numero di cicli richiesti affinche il segnale di fluorescenza raggiunga il livello di threshold o, statisticamente, quando raggiunge il punto di massimo della derivata seconda su un grafico riportante incremento di fluorescenza sul numero di cicli di PCR (47). Per cui, maggiore è la concentrazione di templato target all'inizio della reazione, minore sarà il numero di cicli necessari a raggiungere un incremento di fluorescenza al di sopra della baseline in corrispondenza del quale il segnale registrato incrocia il corrispondente ciclo (Ct). Per cui ciclo soglia e numero di copie di templato sono inversamente proporzionali in una curva fluorescenza-numero di ciclo. Occorre però specificare che il settaggio del livello di threshold non segue una regola matematica ben definita, piuttosto lascia molto all'operatore l'arbitrarietà di scelta in quanto tale valore non influenza significativamente le differenze tra i Ct come nel caso di una quantificazione, quanto invece esclusivamente il singolo ciclo soglia. L'analisi è dunque effettuata in tempo reale ed è eseguita senza procedure di manipolazione post PCR, per cui la caratterizzazione di un amplificato avviene direttamente *in situ* evitando di fatto contaminazioni del prodotto. Pertanto, tale tecnica offre indubbi vantaggi quali (48):

-Amplificazione e analisi accoppiate in un sistema integrato, che riduce la probabilità di errori operativi.

-Monitoraggio continuo dell'andamento dei cicli di PCR mediante uso di reporter fluorescenti.
-Rapida esecuzione (35 cicli in circa 20-40 minuti).
-Elevata sensibilità di identificazione del target (circa 3pg di DNA).
-Elevato range di rilevabilità variabile da 10 a 10^{10} copie.
-Basso rischio di contaminazione dovuto all'utilizzo di un sistema chiuso.
-Possibilità di quantificazione di molecole di DNA.

D'altra parte uno svantaggio alla metodica è rappresentato dalla limitata capacità di condurre esperimenti in multiplex PCR a causa dei limiti delle chimiche supportate dalla strumentazione.

3.4.1 Metodi di Rilevazione del segnale

Una delle prime applicazioni dell'utilizzo di chimiche fluorescenti finalizzate alla simultanea amplificazione e rilevazione del segnale, prevedeva l'impiego di Etidio Bromuro (EtBr) come intercalante del DNA. Essendo una molecola in grado di legare ad alta affinità il DNA a doppio filamento e fluorescere se eccitata da una sorgente UV, venne impiegata inizialmente come reporter negli sviluppi delle prime reazione di quantificazione dell'acido nucleico (49). L'approccio però non risultò molto efficace in quanto l'EtBr lega in modo non selettivo duplex di DNA generici (dimeri di primer) e di conseguenza prodotti di amplificazione non specifici (ampliconi aspecifici). La svolta si ebbe negli ultimi anni con l'introduzione di chimiche impiegate di fatto su nuovi metodi di rilevazione del segnale, dotati di elevata specificità e precisione. Ad oggi, sono due i principali approcci utilizzati per ottenere un segnale registrabile dalla sintesi di un prodotto in Real Time PCR, ed entrambi sono basati sull'impiego di molecole fluorescenti: il primo, più semplice, prevede il legame diretto di tali fluorofori al DNA; l'altro sistema si basa sull'ibridazione specifica di sonde oligonucleotidiche legate covalentemente da fluorocromi (probe fluorogenici).

3.4.1.1 Molecole di legame al DNA

Il sistema di rilevazione del segnale che sfrutta questo approccio è essenzialmente basato sull'impiego della molecola SYBR Green, un intercalante del DNA a doppio filamento (dsDNA) in grado di emettere un segnale di fluorescenza di circa 1000 volte superiore a quello emesso quando non è legata all'acido nucleico in soluzione (50). Tale molecola non è in grado di intercalarsi nel DNA a singolo filamento (ssDNA) nè ha specificità di legame, per cui tali proprietà lo rendono impiegabile per monitorare la produzione di ampliconi generici in quanto affine per qualsiasi dsDNA, circa 100 volte superiore all'EtBr, delinenadone una certa versatilità. Inoltre, risulta stabile alle temperature di amplificazione e alle sue variazioni, non interferendo con l'attività della Taq Polimerasi se non ad elevate concentrazioni. Ad una attenta analisi, alcuni di tali vantaggi sono essi stessi dei contro all'impiego di tale molecola ad ampio spettro, primo su tutti lo svantaggio di legare dsDNA di ampliconi aspecifici e di dimeri di primer. Quest'ultimo aspetto può essere facilmente superato mediante analisi di melting, ovvero determinando quindi a quale temperatura il duplex di primer viene denaturato e, permettendo di conseguenza, l'identificazione dell'amplicone il quale avrà di certo una Tm differente. Analoga analisi, ma con le dovute precauzioni, può essere adottata anche per l'individuazione di ampliconi aspecifici, i quali, basati sulla loro sequenza nucleotidica, mostreranno Tm differenti. Nonostante però la formazione di questi prodotti spuri abbia la possibilità di essere discriminata dal prodotto specifico, ciò non toglie che la formazione di tali aspecifici gioca un ruolo nella efficienza della reazione relativamente all'amplicone target. Un altro potenziale svantaggio potrebbe derivare dalla saturazione del segnale di fluorescenza a seguito di amplificazione di target troppo lunghi. Questo fattore è però facilmente bypassabile riducendo le dimensioni dell'amplicone intorno alle 200-300 bp. Le principali applicazioni quindi del SYBR green sono prevalentemente riconducibili a quelle reazioni di PCR Real Time cosiddette singleplex (una sola coppia di primer) per la messa in evidenza della mera presenza/assenza basata sulla rilevazione o meno della fluorescenza e, in alcuni casi, di multiplex PCR solo se combinata con analisi della curva di melting oltre che per analisi di tipo quantitative (51).

3.4.1.2 Sonde Molecolari a DNA

A differenza dell'impiego di molecole intercalanti il dsDNA, l'impiego di una sonda fluorescente nella rilevazione di un amplificato, si basa sull'ibridazione sequenza-specifica di tale probe su una regione del target di DNA (52), il più delle volte interna e compresa tra i due primers (TaqMan probe) o costituente esso stesso uno dei primer (Scorpions probe). Queste sonde sono costituite da 2 molecole fluorogeniche legate covalentemente al 3' e al 5' di tale oligo e prendono il nome di molecola Reporter e Quencher. Tale approccio sfrutta il principio del trasferimento di energia per risonanza, FRET, utilizzando quindi l'impiego di molecole accettori e donatori. Essenzialmente, il principio di base prevede che se la molecola fluorescente, Reporter, si trova in prossimità del Quencher, il segnale di emissione del Reporter in risposta alla sua eccitazione è assorbito dalla vicinanza della molecola Quencher, risultando quindi in una non emissione di luce. La strategia che sottende l'utilizzo del principio FRET nella rilevazione dell'amplicone prevede che ad ogni ciclo di amplificazione viene reso possibile, mediante idrolisi della sonda o riarrangiamenti, l'allontanamento spaziale delle due molecole, a seguito del quale il Reporter emetterà fluorescenza che non sarà più tamponata dalla molecola Quencher, determinando dunque un segnale fluorescente registrabile esattamente in corrispondenza della formazione dell'amplicone. Nello specifico, sono due i principali vantaggi offerti dall'impiego di tali fluorofori rispetto alle molecole fluorescenti leganti dsDNA. Innanzitutto la specificità di legame, in quanto tali sonde, trattandosi di oligo, sono progettate per legare in maniera sequenza dipendente il target di DNA, eliminando di fatto la formazione di ampliconi aspecifici e dimeri di primer. Poi, la disponibilità di molecole fluorogeniche che emettono a lunghezza d onda differente, permette l'allestimento di saggi multiplex mediante impiego di piu sonde, specifiche per diversi target e legate a differenti fluorocromi. Le sonde molecolari a DNA sono distinte in due categorie: probe di ibridazione e di idrolisi.

Probe di Ibridazione. Il metodo impiega due differenti sonde al fine di massimizzare la specificità della reazione. Una sonda porterà al 3' un fluoroforo donatore in grado di emettere la fluorescenza (solitamente FAM) quando eccitato da una fonte di luce. In particolare però, il suo spettro di emissione si sovrappone con quello di un fluoroforo

accettore (TAMRA, ROX) legato covalentemente al 5' del secondo probe il quale risulta bloccato al 3' per prevenirne l'estensione da parte della Taq Polimerasi. Solo il fluoroforo donatore viene eccitato e, a causa della sovrapposizione di spettro, l'eccitazione viene trasferita secondo FRET alla molecola accettore e quindi emissione di fluorescenza visibile da parte di quest'ultima. Nella miscela di reazione, i due fluorofori legati ai relativi probe, sono separati e, a causa della distanza spaziale tra le due molecole, solo una fluorescenza di base è emessa dal donatore, registrata come background. Durante la reazione, nella fase di annealing, entrambi i probe ibridizzano sulla sequenza target secondo una configurazione testa-coda, cosicchè il donatore potrà trasferire la sua energia ad alta efficienza all'accettore, il quale emetterà un segnale registrabile. Pertanto, solo se entrambi i probe ibridizzano correttamente alla sequenza target e si troveranno giustapposti si svilupperà un segnale. Tale tecnica risulta molto precisa e ulteriormente permette di "riutilizzare" la fluorescenza emessa in quanto i probe non vengono idrolizzati nella reazione, per cui sfruttabili per generare curve di melting. Esempio di probe di ibridazione ampiamente utilizzati sono i Molecular Beacons e gli Scorpion Primers.

Probe di Idrolisi. Il saggio che si avvale dell'impiego di tali sonde, sfrutta la proprietà della DNA polimerasi di possedere attività 5'-3' esonucleasica combinata all'impiego di un probe marcato alle due estremità e in grado di emettere un segnale solo quando degradato da tale attività (Figura 9). Il saggio TaqMan, descritto per la prima volta nel 1996 (53), rappresenta ad oggi il sistema più conosciuto e impiegato, tanto in diagnostica quanto in ricerca. Essenzialmente, in questo tipo di saggio, la sonda TaqMan ibridizza internamente alla regione target del DNA, compresa tra i due primers, e risulta legato da due fluorofori alle estermità. Precisamente, sarà covalentemente legata da un reporter fluorescente al 5', quale FAM, HEX o TET e da un quencher al terminale 3' come TAMRA, Rodamina o DABCYL. Quando il probe è intatto, libero in soluzione o legato alla sequenza target, la fluorescenza del reporter è assorbita dalla molecola quencher secondo il meccanismo di trasferimento di energia FRET. Durante la reazione di PCR, primers e probe annilano sulle rispettive sequenze target e la DNA polimerasi estenderà il 3'-OH del primer subito a monte della sonda. In questa fase di estensione, se il probe è

correttamente ibridato, l'enzima raggiungerà il terminale 5' della sonda TaqMan iniziando a degradarla grazie alla sua attività esonucleasica. In tale modo, si formeranno frammenti di oligo contenenti il reporter i quali si ritroveranno in soluzione lontani dal quencher, motivo per il quale il trasferimento di energia non potrà avere luogo e quindi una fluorescenza verrà emessa e registrata. Anche in questo caso, l'incremento di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di probe clivato dall'enzima e quindi alla quantità di templato iniziale, riducendo dunque, a differenza della classe di molecole intercalanti il DNA, la presenza di falsi positivi. Inoltre, a differenza degli altri metodi, l'idrolisi della sonda da parte della Taq polimerasi è essenziale per la generazione di un segnale, in quanto un suo semplice allontanamento, senza clivaggio, inficierebbe la precisione della quantificazione a causa della riduzione del segnale. Per cui la quantità di probe idrolizzato dipende particolarmente dalla sua localizzazione nel DNA target e dalla sua sequenza (54). La progettazione di un oligo TaqMan richiede pertanto particolari accorgimenti sebbene le condizioni di PCR e i cicli di temperatura adottati siano pressappoco costanti tra i diversi test all'interno della stessa metodica. Innanzitutto, un probe di questo genere sarà progettato in modo da essere più lungo in termini di basi rispetto ai primers impiegati nella medesima reazione, in quanto la polimerasi degraderà la sonda solo se essa risulterà ibridata sul target, per cui le condizioni di temperatura dovranno essere ideali affinchè il sistema funzioni correttamente. Generalmente, la temperatura di melting di un oligo TaqMan dovrebbe essere di circa 70°C, precisamente circa 10°C maggiore di quella della coppia di primers impiegati, motivo per il quale tali sonde sono costituite da circa 20-32 nucleotidi, raramente di più poichè si perderebbe l'effetto di risonanza tra le molecole fluorescenti, inficiando dunque il segnale di fondo. Pertanto un saggio TaqMan, cosi progettato, coniuga le fasi di annealing ed estensione in un unico step, ad una unica temperatura di circa 60°C, il che assicura il legame del probe alla sequenza durante la fase di estensione del primer. Questa fase garantisce anche la massima attività 5'-3' esonucleasica da parte dell'enzima (55). Chiaramente questo stadio è estremamente critico per la buona riuscita del saggio, in quanto occorre progettare il sistema di modo che l'effettiva emissione di luce sia realmente proporzionale al numero di molecole bersaglio in reazione. Se la reazione di annealing della sonda infatti non avvenisse con i tempi giusti, le emissioni di fluorescenza non rifletterebbero la quantità di

target in reazione. Altro fattore da tenere in considerazione per il disegno di una sonda TaqMan è la composizione in basi, la quale dovrebbe rispettare più o meno le stesse condizioni impiegate per il disegno dei primers e, in particolare, evitando Guanine al 5' in quanto tale nucleotide potrebbe mascherare il segnale del reporter anche dopo il taglio della sonda, agendo di fatto come molecola quencher. Dovrebbe inoltre contenere più residui di citosina che guanina, il che risulta bypassabile disegnando un probe sulla base del filamento senso o antisenso. Partendo dunque da una buona progettazione del sistema, piccoli aggiustamenti dovranno essere effettuati per l'ottimizzazione della metodica. Il sistema presenta quindi indubbi vantaggi quali la possibilità di allestire reazioni di PCR multiplex mediante differente marcatura di ciascuna sonda ed emissione di un segnale di fluorescenza proporzionale al prodotto e di conseguenza al templato. Di contro però, a fianco al suo elevato costo, presenta lo svantaggio di possedere una sensibilità leggermente inferiore rispetto ad altri approcci, quali molecular beacons, e un modesto livello di fluorescenza di background, derivato proprio dalla sua lunghezza nucleotidica. Le sonde Taq Man possono essere di due tipi: non MGB, ovvero quelle appena descritte e quelle invece di tipo MGB.

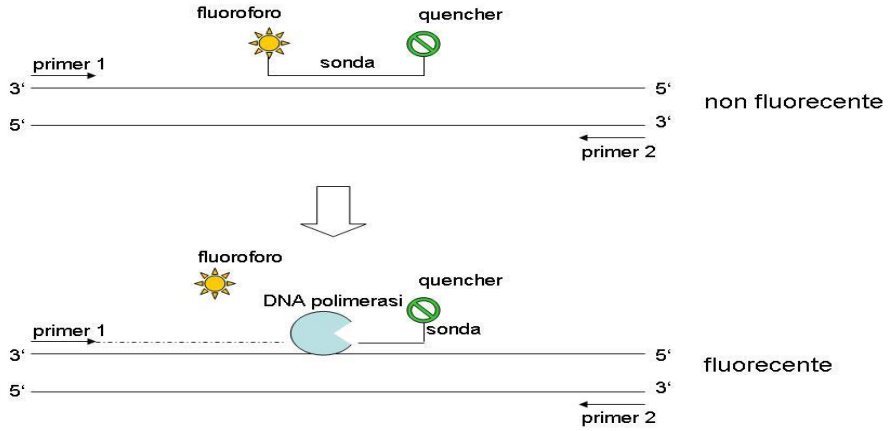


Figura 9. Rappresentazione grafica del meccanismo di funzionamento delle sonde di idrolisi TaqMan in una reazione di Real Time PCR.

TaqMan MGB Probe. Come già definito, una classica sonda TaqMan di tipo non MGB, richiede una temperatura di melting significativamente più alta di quella impiegata per la

coppia di primer affinchè possa avvenire l'ibridazione e la degradazione della stessa e, per tale ragione, risultano generalmente più lunghe degli stessi primer. Per l'allestimento dunque di alcune tipologie di saggi, in cui un elevato livello di specificità è richiesto, la costruzione di una lunga sonda implica il fatto che anche un singolo mismatch di base determinerà solamente un lieve effetto sulla stabilità di legame della sonda al target, consentendo comunque l'annealing e il suo clivaggio durante la fase di estensione e perdendo dunque in parte la specificità di reazione. Ancora, la composizione in basi della sonda risulta anch'essa fondamentale in quanto l'impiego di sonde costituite da stretch di Guanine spesso determinano strutture secondarie le quali possono determinare una inefficiente ibridazione della sonda, cosi come probe costituiti da residui A/T determineranno basse temperature di melting che indurranno di conseguenza all'incremento del numero di basi costituenti la sonda al fine di compensare la riduzione in Tm. Oltretutto, la scelta di una piccola regione target di DNA potrebbe scontrarsi con la progettazione di una sonda, la quale potrebbe necessitare di una maggiore lunghezza per una efficienza ottimale. L'impiego pertanto delle sonde TaqMan di tipo MGB risolve problemi di tale natura, in quanto costituite, al medesimo modo del precedente tipo, da una molecola reporter al 5' e da una quencher all'estremità 3', oltre che da una molecola di legame al solco minore del DNA, detta appunto MGB (Minor Groove Binding) (Figura 10). Tali sonde utilizzano dunque una molecola legante il solco minore del DNA al fine di incrementare la stabilità di legame e la temperatura di melting del duplex di DNA quando la stessa sondà ibridizzerà sul target, anche nei casi di piccole sonde. Tali classi di molecole sono composte da diverse subunità tenute insieme da legami peptidici e stabilizzate nel solco minore da interazioni idrofobiche e da legami a idrogeno. Al momento del legame della sonda al DNA target, il motivo MGB si ripiega a mezzaluna all'interno del solco minore permettendo dunque di interagirvi saldamente. Tale legame non fà altro che incrementare la forza di interazione della sonda al DNA target determinando di fatto un'innalzamento della Tm del probe stesso di circa 10°C e consentendo quindi l'impiego di sonde più corte in tutti quei casi in cui differenziare specie simili può rappresentare un ostacolo.

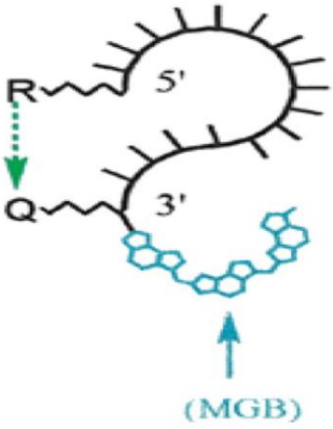


Figura 10. Rappresentazione schematica di una sonda TaqMan-MGB. R: Reporter; Q: Quencher

Tali probe infatti risultano composti in numero variabile da 12 a 20 nucleotidi e permettono quindi di legare il target in maniera più specifica e salda, mantenendo al contempo una elevata temperatura di melting. In questo modo, singoli mismatch di base avranno un notevole impatto sulla Tm del complesso sonda-target, permettendo cosi una maggiore specificità di reazione. Vantaggi di tale tecnica sono quindi rappresentati i) dall'uso di corte e specifiche sonde ii) maggiore sensibilità e specificità di reazione per target difficili iii) possibilità di impiego in reazioni multiplex oltre che iv) possibilità di customizzare le sonde per l'identificazione genetica e il suo impiego con qualsiasi sistema di detection per Real Time PCR.

3.5 Multiplex Real Time PCR

Tale metodica non è altro che una estensione di applicazione della classica Real Time PCR in cui due o più loci sono simultaneamente amplificati e analizzati all'interno della medesima reazione (56). Dalla sua introduzione negli anni '90, tale sistema ha trovato ampia applicazione in diverse aree, in particolare quelle riguardanti la caratterizzazione di polimorfismi genetici con riferimento al settore alimentare (57-58). Tale tecnica, applicata sia per saggi qualitativi che quantitativi, è realizzabile utilizzando un numero variabile di sonde fluorescenti specifiche e dipendenti dal numero di target da identificare

e, ancora più importante, è necessario che esse siano marcate con un unico fluorocromo in modo che il segnale emesso sia rilevato in maniera univoca. Pertanto occorrerà una strumentazione in grado di discriminare le fluorescenze emesse dai differenti reporter i quali, coniugati con una ben specifica sonda, si ritroveranno simultaneamente in un unico pozzetto di reazione. La fluorescenza emessa quindi da ciascuna sonda sarà usata per quantificare separatamente ciascun target di DNA, purchè un segnale significativo sia prodotto per ciascun amplicone. Poichè dunque più saggi di amplificazione vengono realizzati simultaneamente nel medesimo pozzetto, utilizzando quindi diverse sonde o primer oltre che differenti templati di DNA intesi come miscele, fenomeni di competizione per i reagenti (dNTPs e Taq principalmente) o di inibizione sono spesso riscontrabili e di fatto responsabili dell'esito del saggio; è per tale motivo che l'applicazione di tale metodica necessita di una messa a punto ai fini della sua validazione. Questo risulta perentorio in quanto diversi scenari possono verificarsi quando si decide di implementare un tale sistema, uno su tutti il caso in cui uno dei target risulta overespresso rispetto all'altro o agli altri presenti, portando di fatto a saturazione la reazione di amplificazione per uno dei bersagli. Tale fenomeno è strettamente relato alla quantità di templato di partenza, il quale, nel caso di una miscela di DNA in cui uno dei target è presente ad una differente percentuale rispetto all'altro, determinerà una amplificazione preferenziale del target più abbondante nella miscela, che consumerà precocemente i reagenti (dNTPs e Taq) influenzando dunque l'amplificazione della specie meno abbondante. Questo problema può essere superato limitando la quantità di primer disponibile per il target più abbondante, cosiddetto primer-limitation. In conseguenza di ciò, quella specifica coppia di primers sarà rapidamente utilizzata per la reazione andando a plateau precocemente e lasciando al contempo una sufficiente quantità di reagenti per l'amplificazione del target meno abbondante presente nella miscela. In pratica, dovrà essere determinata la quantità minima di primer per amplificare quel target di DNA che dia il più basso valore di Ct senza interferire con il medesimo valore del target meno abbondante. Chiaramente, limitare la concentrazione di una coppia di primers avrà influenze sul valore massimo di fluorescenza registrato, nello specifico, riducendolo di un certa quantità senza però comprometterne al contempo il suo valore di Ct. Congiuntamente, l'utilizzo di fluorofori dotati di alta o di bassa intensità di emissione

del segnale, rispettivamente in funzione di quei target presenti a bassa o ad alta copia, può essere di ausilio nel compensare tale riduzione del segnale di fluorescenza. Risulta quindi intuibile che, maggiori saranno i target da identificare in una rezione multiplex, maggiori saranno le limitazioni all'applicazione della metodica, determinando di fatto alcune difficoltà alla sua implementazione. Innanzitutto la limitata disponibilità di reporter fluorescenti dotati di una spettrale di emissione non sovrapponibile in fase di analisi del dato. L'impiego infatti di diversi probe di ibridazione richiede l'uso di differenti fluorofori che siano tra di loro compatibili. Una seconda limitazione è legata alla strumentazione utilizzata, la quale sarà dotata di specifiche caratteristiche di eccitazione e rilevazione del segnale e che, di conseguenza, influenzerà la scelta dei fluorofori da utilizzare per lo sviluppo della reazione. Un altro ostacolo alla realizzazione di un sistema multiplex è associato ai già accennati fenomeni di competizione e inibizione che potenzialmente potrebbero instaurarsi nella miscela di reazione, oltre che alle concentrazioni dei reagenti impiegati. Interazioni inattese tra le coppie di primer e tra primer e sonde sono direttamente proporzionali al numero di molecole bersaglio da identificare, in grado di inficiare l'efficienza della reazione soprattutto se questi presenteranno complementarietà di sequenza per i differenti target di DNA contenuti nella miscela. In tal caso si instaurerebbero fenomeni competitivi di ibridazione di primer e sonde alle rispettive molecole bersaglio e conseguente ridotta o mancata amplificazione. Generalmente in una reazione multiplex, primer e probe per il singolo target sono utilizzati in un rapporto di 2:1 e impiegando, almeno in prima battuta, concentrazioni equimolari dei primers. Per tale motivo, risulta dunque essenziale che i dati ottenuti da una reazione di multiplex siano sempre verificati e confermati mediante esecuzione del medesimo test come singolo saggio (singleplex). Un buon compromesso ai suddetti limiti è rappresentato dall'uso di sonde TaqMan, in particolare di tipo MGB, le quali si prestano molto bene nell'impiego in reazioni multiplex, sia per sensibilità che per efficienza, ma soprattutto perchè il quencher di tali sonde non emette alcuna fluorescenza o comunque non significativamente valida, minimizzando dunque il cross-talk tra i segnali e rendendo quindi possibile l'aggiunta di più fluorofori nella medesima reazione. Di contro, la presenza di indiscussi vantaggi rende comunque la metodica applicabile su larga scala. In prima battuta l'incrementato throughput che ne deriva dalla possibilità di

saggiare più campioni in un unico esperimento; la riduzione del consumo di materiale di partenza e di reagenti; la minimizzazione delle variabili associate alla preparazione della reazione (es. errori di pipettaggio) e dunque la maggiore precisione, oltre che la standardizzazione in quanto potenziali errori influenzeranno i diversi target al medesimo modo.

3.6 Ottimizzazione della reazione di Real Time PCR

L'ottimizzazione della metodica di Real Time PCR risulta critica ai fini della buona riuscita di un saggio, in quanto una errata messa a punto del sistema comporterà significative variazioni nell'esecuzione del test. Date le caratteristiche di estrema sensibilità della metodica, particolari attenzioni dovranno essere adottate nella messa a punto ed esecuzione del test in modo da prevenire artefatti di tecnica. È dunque importante l'uso di appropriati controlli di reazione e ottimizzazione della metodica affinchè il saggio funzioni come ci aspetti e non dia risultati di dubbia interpretazione. Parametri quali sensibilità, specificità di reazione ed efficienza sono quindi di fondamentale importanza per il buon esito della reazione e per la validazione del metodo applicato, oltre che dipendenti da una serie di accorgimenti relativamente alla concentrazione di primer e sonda da utilizzare, dei reagenti costituenti la mix di reazione e dalle condizioni di PCR da impiegare. Risulta pertanto essenziale assicurare che tali parametri siano settati in modo da ridurre al minimo le variazioni intrasaggio garantendo la riproducibilità del metodo e del dato, nonchè la sua robustezza, ovvero la capacità di non risentire in maniera significativa delle normali variazioni analitiche del saggio, particolarmente non interferendo con il Ct del test e determinando solo minime differenze nella fluorescenza registrata (59). Diverse sono le considerazioni da adottare per lo sviluppo di un test identificativo di specie mediante Real Time PCR e nello specifico riguardano il templato di DNA, primer e probe, mix di reazione e scelta dei fluorofori.

Considerazioni sul templato. Concretamente il frammento di DNA da amplificare in una reazione di PCR Real Time varia da 80 a 170 bp in lunghezza, idealmente intorno a 100 bp e mai oltre le 200 bp. Ampliconi più corti permettono infatti una maggiore

probabilità di successo di ibridazione della sonda sul target, un maggiore efficienza di amplificazione e una incrementata attività esonucleasica nel caso di utilizzo di sonde TaqMan. Ampliconi maggiori riducono notevolmente la probabilità di successo della reazione. Un altro fattore da considerare è la percentuale di residui GC sul target, la quale dovrebbe oscillare dal 40% al 60% in modo da evitare la formazione di strutture secondarie che inficierebbero la formazione del duplex DNA-Probe e DNA-Primers (60). Relativamente alla concentrazione di templato da impiegare, questa sarà variabile, in quanto una eccessiva quantità di DNA potrebbe essere responsabile della inibizione della reazione di amplificazione a causa di un'azione chelante dello stesso nei confronti del $MgCl_2$. In linea di massima, se il Ct di reazione è localizzato entro i primi 10 cicli occorrerà diluire il campione, se viceversa, il Ct è oltre il 30 ciclo, una maggiore concentrazione di DNA dovrà essere utilizzata per la reazione (59). Generalmente sono utilizzabili quantità variabili da 100 pg a 1 µg di DNA genomico, piu frequentemente 100 ng di DNA sono sufficienti per garantire una buona resa di reazione.

Disegno del Probe. Come già definito, la lunghezza di un probe fluorescente dovrebbe oscillare da 20 a 30 nucleotidi in lunghezza. Sonde più lunghe potrebbero essere anche utilizzate se necessario, ma in tali casi, specialmente se si tratta di sonde di tipo TaqMan, sarebbe conveniente porre la molecola Quencher in mezzo alla sequenza della sonda e non all'estremo 3', al fine di rendere efficiente il trasferimento di energia. La composizione in basi dovrebbe avere una percentuale di GC non eccedente l'80%, idealmente tra 30% e 70%, e favorire i residui di citosina a quelli di guanina. Ancora, vanno evitate nella progettazione di una sonda stretch di basi identiche, particolarmente per i residui di Guanina che, come già descritto, possono agire da quencher mascherando il segnale emesso se localizzate all'estremità 5'. La temperatura di melting dovrebbe essere di circa 8-10°C maggiore rispetto a quella dei primers di amplificazione in modo da ibridare sul target prima dei primers stessi ed andrebbe oltretutto evitato qualsiasi tipo di appaiamento tra la sonda (self-complementary) e tra essa e i primers (primer-probe dimer) il quale porterebbe al sequestro di tali reagenti dalla reazione. Relativamente alla localizzazione della sonda sul target, è bene che il suo estremo 5' sia localizzato il più vicino possibile al 3'-OH del primer forward, ma senza sovrapporsi con esso, favorendo in questo modo l'attività esonucleasica della DNA polimerasi (60). Questi accorgimenti

sono validi anche nel caso di implementazione di un sistema multiplex, facendo riferimento al fatto che i polimorfismi da identificare andrebbero localizzati pressappoco al centro della sonda e che le differenti sonde abbiano le medesime temperature di melting. Per quanto concerne la concentrazione di probe da utilizzare, questa dovrebbe essere messa a punto dopo l'ottimizzazione della concentrazione dei primers e comunque in un range variabile da 0.1 a 0.4 µM, utilizzando poi quel valore di concentrazione che fornisce il più basso valore di Ct congiuntamente al più alto valore di fluorescenza per quel dato target (59).

Disegno dei Primers. Al pari delle sonde, i primers andrebbero disegnati mediante l'impiego di appositi software, facendo particolare attenzione alla regione da amplificare la quale determinerà le dimensioni dell'amplicone. In linea generale vanno evitate potenziali strutture secondarie, sequenze ripetitive e palindromi all'estremità 3' degli oligo. Entrambi i primers non devono infatti possedere sequenze complementari che porterebbero alla formazione di dimeri o a tratti di autocomplementarietà o hairpin, i quali inficierebbero l'efficienza di amplificazione (60). Ancora, il contenuto in residui GC dovrebbe mediamente oscillare tra il 40% e il 70% della sequenza e idealmente in percentuale simile tra di loro, evitando al contempo serie successive di tali residui (<4) particolarmente al 3' al fine di prevenire fenomeni di slippage della polimerasi e la formazione di tetraplex di Guanine. La lunghezza ideale dovrebbe oscillare tra le 17 e le 25 bp, in quanto primer più corti perdono di specificità di legame, per cui è sempre bene, dopo il loro disegno, controllarne la specificità complessiva mediante ricerca sul database BLAST. La temperatura di melting, come definito, dovrà essere inferiore a quella della sonda e non differire per piu di 2°C tra i due primers (tipicamente tra i 63°C e i 65°C). La Tm dovrà inoltre essere superiore a quella di una possibile struttura secondaria del templato, di modo che a quella specifica temperatura, la formazione di eventuali strutture secondarie sono sfavorite durante la fase di annealing dei primer stessi. Inoltre, per quanto concerne il sistema multiplex, è bene ridurre di 2-4°C la temperatura di annealing, in quanto sebbene nella reazione singleplex la medesima coppia di primer dia una efficiente amplificazione ad una determinata temperatura, evidenze mostrano che in un sistema multiplex una temperatura di annealing lievemente minore della corrispettiva in

singleplex sia più performante (56). La concentrazione ottimale dovrà sperimentalmente essere determinata e generalmente oscilla da 0.1 a 0.5 µM per ciascun primer, anche se in taluni casi, come già definito, la concentrazione del primer forward e reverse può essere differente (59). Chiaramente una eccessiva concentrazione di primers porterà alla formazione di aspecifici a causa di errate ibridazioni sul templato (mispriming), di contro, una bassa quantità potrebbe inficiare allo stesso modo la reazione ma in maniera poco significativa in quanto potrebbe essere già stato registrato un segnale di amplificazione significativo ancora prima che i primer si esauriscano.

Considerazioni sulla Master Mix. La preparazione di una master mix di tipo in-house può rappresentare un'ottima alternativa a quelle preformate e disponibili in commercio, in quanto la sua messa a punto potrebbe essere più performante per il target scelto, cosi come per la chimica utilizzata e lo strumento di analisi impiegato. Fondamentalmente essa richiede l'ottimizzazione di componenti quali Taq Polimerasi, Buffer, dNTPs e Magnesio cloruro ($MgCl_2$). La quantità di Taq da utilizzare è essenziale e procede di pari passo con quella del $MgCl_2$, in quanto una sua bassa concentrazione porterebbe ad una inefficiente amplificazione determinando quindi una bassa fluorescenza e un alto valore di Ct. Di contro, elevate concentrazioni dell'enzima possono favorire la formazione di aspefici di reazione e di primer-dimers (59). Tale inconveniente può comunque essere superato utilizzando delle Taq di tipo hot-start, le quali incrementano la stringenza della reazione e la sensibilità del saggio (61). La composizione del buffer riveste anch'essa notevole importanza in grado di influenzare la temperatura di melting sia dei primers che della sonda, cosi come la processività dell'enzima e la formazione di strutture di G-quadruplex dei primers. Quest'ultimo fattore può essere risolto utilizzando buffer di reazione privi di ioni K^+, responsabili per l'appunto della formazione di tale struttura (62). La concentrazione dei dNTPs da impiegare in reazione è invece piuttosto variabile e ampia, generalmente infatti la sua quantità non influenza significativamente i valori di Ct ma solo la quantità di fluorescenza emessa. Infine, la concentrazione di $MgCl_2$ rappresenta un punto chiave nella messa a punto di un saggio Real Time in quanto gli ioni Mg^{2+} influenzano tanto la specificità della reazione quanto la resa (63). Concentrazioni troppo alte possono portare ad una incompleta denaturazione del templato

e quindi ad una bassa resa di reazione oltre che determinare la formazione di aspecifici. Di contro, livelli troppo bassi di ioni Mg^{2+} riducono l'attività della polimerasi, la quale richiede tale componente come cofattore. Come per la quantità di sonda da impiegare, anche per il $MgCl_2$, la concentrazione ottimale è quella che fornisce il più basso livello di Ct e il più alto livello di fluorescenza, oscillando generalmente tra i 2 mM e i 5 mM. Per quanto concerne l'ottimizzazione di una multiplex Real Time PCR, il consumo di tali reagenti è maggiore che in una singleplex e, come già discusso, può inficiare l'amplificazione del target meno abbondante. Per cui, alcuni aggiustamenti dovranno essere apportati. Una multiplex infatti richiede una maggiore quantità di polimerasi e di dNTPs, tale da assicurare l'amplificazione di tutti i bersagli ricercati. Inoltre, la presenza di una maggiore quantità di DNA in miscela derivante dagli ampliconi, cosi come una aumentata concentrazione di primer/probe a causa dei multipli target da identificare e l'eccesso di dNTPs necessario per la formazione degli amplificati, ridurranno la quantità di Mg^{2+} libero disponibile per la polimerasi a causa di un effetto chelante su esso, per cui la sua concentrazione dovrà essere lievemente aumentata.

Considerazione sui Fluorofori. Durante la fase di progettazione della sonda è importante considerare la scelta del fluoroforo da impiegare e valutarne la sua compatibilità con la molecola quencher. In particolare, il sistema FRET funziona quando donatore e accettore si trovano ad una distanza di circa 100 Å, equivalente a circa 30bp (un giro d'elica di DNA equivalente a 3,4 Å), per cui è importante valutare lo spettro di eccitazione e di emissione delle molecole utilizzate, specialmente quando si implementa un sistema multiplex. La classe di molecole maggiormente impiegate come quencher sono dette BHQ (Black Hole Quencher) le quali presentano un basso o non significativo livello di fluorescenza di base e al contempo un ampio spettro di assorbimento di lunghezze d'onda. Tali molecole sono quindi particolarmente versatili in quanto utilizzabili con diverse classi di reporter fluorescenti incrementando di fatto la possibilità di sviluppo di reazioni multiplex Real Time PCR.

3.7 Analisi dei dati e parametri di valutazione

I dati derivanti da una reazione di Real Time PCR possono essere analizzati mediante applicazione di diversi metodi, strettamente dipendenti dal tipo di saggio implementato e dall'output ricercato. Essi rivestono inoltre notevole importanza ai fini della valutazione del buon esito della reazione e, nello specifico, possono fornire risultati sia qualitativi in termini di presenza/assenza del target ricercato, che di tipo quantitativi. Per quanto concerne l'analisi quantitativa, il target amplificato può essere determinato mediante impiego di molecole fluorescenti intercalanti il dsDNA, ma anche utilizzando delle sonde sequenza specifica (TaqMan probe). L'utilizzo di fluorofori intercalanti condurrà ad un incremento della intensità di fluorescenza durante ciascun ciclo di PCR permettendo quindi la quantitificazione del prodotto formato. Ad ogni modo, la specificità di questo tipo di saggio, come già discusso, è limitata in quanto tali fluorofori legheranno qualsiasi dsDNA che si formerà durante la reazione inficiando pertanto la precisione di quantificazione del DNA bersaglio. Un saggio più specifico, e che meglio si adatta allo scopo di questo lavoro, è rappresentato dall'uso di specifiche sonde di DNA, complementari al target da quantificare. Il loro uso, incrementa notevolmente la sensibilità e la specificità della reazione permettendo la quantificazione del target anche in presenza di DNA non specifico, come nel caso delle misture alimentari. Per effettuare un'analisi quantitativa, risulta di cruciale importanza la valutazione delle curve di amplificazione generate. Come già definito, ciascuna curva consiste di tre distinte fasi: una iniziale, in cui nessuna misurazione può essere effettuata in quanto fase precoce e non rilevabile dallo strumento, una esponenziale e una di plateau. La stima del numero di copie di templato nel campione di partenza può essere estrapolato dal numero di cicli necessari affinchè il segnale di fluorescenza (Rn), per un dato target, incrementi significativamente al di sopra della baseline, determinando cosi la scelta un arbitrario valore di threshold. Il punto in cui tale valore interseca la curva determina il Ct, ed è localizzato per l'appunto all'interno della fase esponenziale in quanto espressione diretta dell'accumulo di prodotto. Uno dei metodi oggi impiegati per la conduzione di analisi di tipo quantitative, consiste nell'utilizzo di standard di DNA a concentrazione nota, specificatamente diluiti allo scopo di generare delle curve di amplificazione dal quale estrapolare dei valori di ciclo soglia per ognugna di essa. Questi valori di Ct così

registrati sono utilizzati ai fini comparativi con i rispettivi Ct dei campioni incogniti per generare un valore numerico. Essenzialmente, in un saggio quantitativo di tale tipo, definito assoluto, la curva generata dagli standard di DNA diluiti e a titolo noto viene utilizzata come referenza per determinare il numero di copie di DNA di uno specifico trascritto a concentrazione sconosciuta. I valori dei Ct generati per ciascuna curva dello standard di DNA vengono infatti plottati, con un intervallo di confidenza del 95%, su un grafico in rapporto alla loro concentrazione logaritmica, numero di copie o al fattore di diluizione per generare una retta di regressione lineare, detta curva di taratura o curva standard. Essendo noto quindi il Ct di ciascuno standard e la sua concentrazione iniziale, si può facilmente ricavare il titolo dei campioni ignoti interpolando il loro valore di Ct in tale curva (Figura 11). Il Ct rappresenta dunque un indicatore del numero di copie iniziali ed è funzione dell'efficienza della reazione. Poichè infatti, in linea teorica, con un'efficienza di reazione del 100%, ad ogni ciclo di PCR il numero di copie di quel target raddoppia, ne deriva che un numero di copie iniziali doppio anticiperà il Ct di un ciclo, mentre un numero di copie pari a metà lo posticiperà di uno. Questo implica che Ct e concentrazione di templato sono strettamente correlati: specificatamente il Ct di una curva è inversamente proporzionale al logaritmo del numero iniziale di copie (49). Ancora, la definizione di un dato Ct dipenderà dalla threshold settata e in particolare dal momento in cui la fluorescenza diventa significativa. Fluttuazioni del segnale di fluorescenza non dovute a fenomeni di amplificazione sono sempre presenti all'interno di un saggio quantitativo e influenzeranno quindi il valore di Ct e indirettamente l'efficienza. La normalizzazione di tale emissione risulta quindi essenziale per correggere tali variazioni causate da cambi nella concentrazione o di volume dei reagenti in ogni pozzetto, cosi come le variazioni strumentali in termini di rumore di fondo. Per tale motivo viene usato un fluoroforo, detto referente passivo, comunemente ROX, al fine di normalizzare le oscillazioni di fluorescenza. Per cui la fluorescenza (Rn) è calcolata dallo strumento mediante rapporto tra il segnale emesso dal quel dato fluoroforo scelto e quello emesso dal referente passivo. Per questi motivi, il valore di efficienza complessivo della reazione è ricavato dalla bontà della curva standard e dalla valutazione di alcuni parametri ad essa connessi quali il coefficiente di correlazione (r^2), l'intercetta nell'asse (Y) e la slope (s). Il coefficiente r^2 è una misura di come ogni punto della retta standard

correla con la curva. In pratica riflette la linearità della retta e, idealmente, un valore >0.980, indica come i valori in ordinata possano essere utilizzati per predirre accuratamente i valori in ascissa. Pertanto rappresenta un indice di bontà dell'adattamento. L'intercetta Y, indica quel valore di Ct atteso necessario a rilevare il più basso numero di copie di DNA target nel campione. Sebbene la metodica, in via teorica, è in grado di rilevare una singola copia di un target, un numero di copies da 2 a 10 è utilizzato come valore di riferimento che può essere affidabilmente identificato in una qPCR Real Time. La slope rappresenta invece espressione diretta dell'efficienza di reazione, dove una efficienza pari a 1 (massimo teorico ottenibile) equivale ad un valore di slope di -3.32. L'efficienza di amplificazione, in particolare, varia in funzione del progredire dei cicli di PCR, assumendo una progressiva riduzione di valore man mano che la reazione procede a causa di tutti quei fenomeni che condurranno la reazione a plateau.

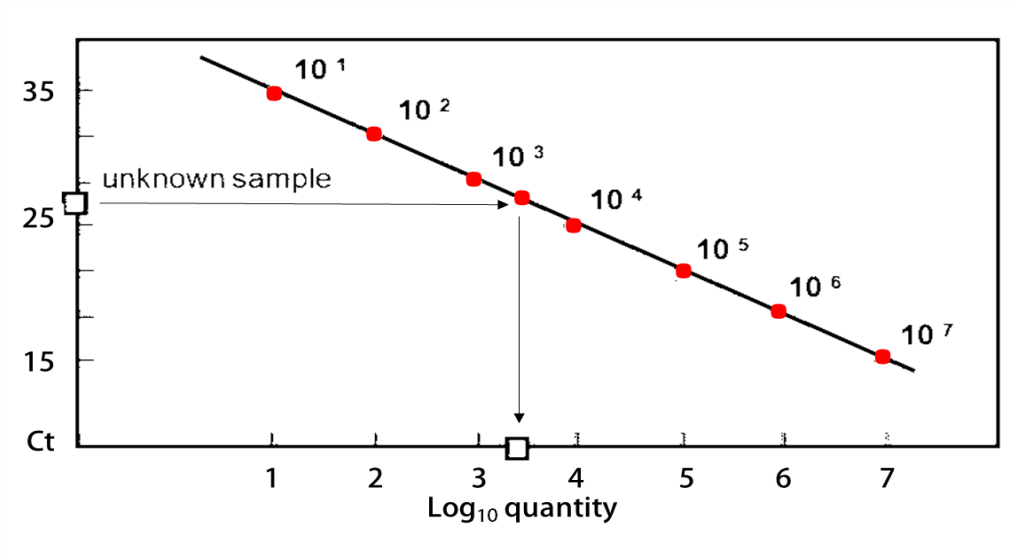


Figura 11. Curva di calibrazione degli standard di DNA a titolo noto. In ascissa è riportato il logaritmo decimale della quantità di DNA per ciascuno standard impiegato; in ordinata il ciclo soglia corrispondente.

Per meglio definire il concetto di slope, occorre però ricordare come l'equazione di una retta sia data dall'espressione: $y = mx + q$, dove q rappresenta l'intercetta y ed m il coefficiente angolare o pendenza della retta (slope) del valore x. Più specificatamente, il valore di y equivale alla quantità di amplificato che si forma dopo n cicli; il valore di q

equivale invece alla quantità iniziale di molecola bersaglio; il valore *m*, invece altro non è che espressione diretta dell'efficienza di reazione $(1+E)^n$ desumibile proprio dalla pendenza della retta (Figura 12). Nella prima parte del processo di amplificazione infatti, il valore di E risulta massimo (tendente a 1) e costante; al crescere dei cicli il valore diminuisce sino a 0 in cui la retta diventa di fatto una curva, parallela all'asse delle ascisse e con slope pari a 0 (64). Per cui, calcolando la pendenza della retta di calibrazione tramite il numero di copie di templato e lo specifico Ct in un determinato intervallo, è possibile in ogni punto conoscere l'efficienza della reazione secondo la relazione $E = 10^{(-1/slope)}-1$. È chiaro che tale tipo di analisi, definita quantitativa assoluta, assume a priori che l'efficienza di amplificazione complessiva della reazione, misurata sulla base dagli standard di DNA, sia identica a quella dei campioni incogniti, motivo per il quale la curva di calibrazione è usata per inferire il numero iniziale di copie di DNA nel campione ignoto. In realtà, tale valore è estremamente variabile all'interno di ogni saggio sebbene la seduta di analisi sia la medesima e, dipende, da una serie di variabili che caratterizzano ogni campione da testare e che, soprattutto, contraddistinguono uno standard da una matrice biologica.

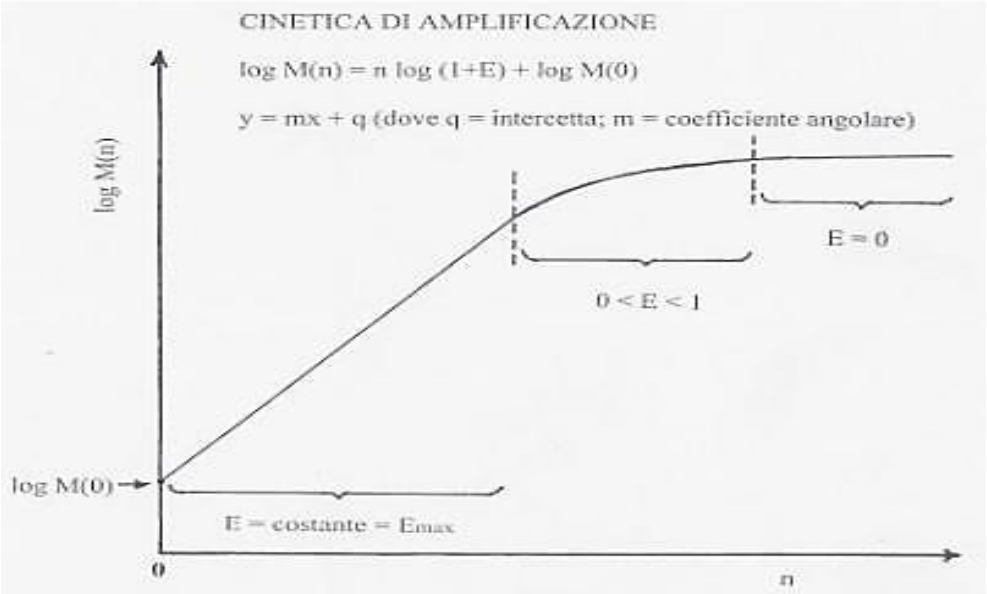


Figura 12. Cinetica di amplificazione di un target di DNA. In ascissa è riportato il numero di cicli n; in ordinata il logaritmo della concentrazione di DNA (64).

Questo tipo di variabilità biologica è essenzialmente dovuta a errori di tipo operativi e a possibili fenomeni inibitori della reazione di amplificazione che interessano le matrici e gli standard in maniera differente. La presenza di una elevata concentrazione di grassi, collagene, glicogeno, polisaccaridi, mioglobina, cosi come enzimi contenuti nelle matrici alimentari, possono causare inibizione della reazione di PCR, inficiandone di fatto l'efficienza (65) (Tabella 2). Oltre a questi vanno aggiunti anche tutti quei composti organici impiegati per l'estrazione dell'acido nucleico e la preparazione del campione stesso quali fenolo, etanolo, SDS, EDTA e Sali (67) che, insieme i costituenti della mix di reazione, ne influenzeranno il buon esito. In tali condizioni infatti, l'osservazione di differenti valori di Ct per i campioni in esame indurrebbe a pensare alla presenza di diverse quantità di templato, determinando quindi grossolani errori di quantificazione. Pertanto, la comparazione assoluta di valori di Ct, ha senso se si escludono i fenomeni di cui sopra e standardizzando il più possibile le condizioni di amplificazione per tutti i target da amplificare (come nel caso di un sistema multiplex), compresi gli standard. Affinchè la quantificazione corrisponda quanto più fedelmente alla vera concentrazione di templato, risulta utile allestire una curva di standard caratterizzata da un minimo di 5 logaritmi di concentrazione di templato ottenuti per diluizione di una soluzione stock e almeno 2 replicati per ciascun logaritmo (68). Questo si rende necessario in quanto, se la reazione venisse allestita con un numero minore di replicati insieme ad un ristretto intervallo di logaritmi di concentrazione, la variazione di slope e qundi di efficienza di reazione, risentirebbe di notevoli fluttuazioni statistiche agenti sul fattore di diluizione del singolo campione.

Sample	PCR inhibitor
DAIRY	
Milk (raw, skimmed, pasteurised, dry), cheese (dry, soft).	Fat, protein, calcium, chelators, dead cells.
MEAT	
Chicken (meat, carcass rinse, skin homogenates, whole leg, sausage, muscle); turkey (leg, muscle, skin, internal organs); beef (ground, mince, roast); pork (ham, minced, raw whole leg, ground, sausage, meat rolls).	Fat, protein, collagen (blood).
SEAFOOD	
Fish (cakes, pudding, marinated, sliced); salmon (smoked), shrimps, shellfish (muscles, oysters).	Phenolic, cresol, aldehyde, protein, fat.

Tabella 2. Inibitori di PCR in prodotti lattiero-caseari, carnei e ittici (66).

Massimizzare dunque il numero di standard diluiti, incrementa il cosiddetto range dinamico del saggio e la sua precisione, riducendo la variazione matematica per campione intesa come deviazione standard (DS). Generalmente un valore di efficienza compresa tra il 90% e il 110% è indicatore di una buona reazione il che equivale ad un valore di slope tra -3.58 e -3.10 (69); valori maggiori di efficienza sono spesso riferibili a errori procedurali o a coamplificazione di prodotti non specifici.

3.8 Importanza della validazione del metodo

Un sempre più crescente numero di test per l'identificazione di specie sono oggi disponibili. Questi vanno dai test che impiegano la piu comune tecnica di PCR e delle sue varianti, sino all'applicazione dei microarray e delle tecniche di tipizzazione molecolare. Date le caratteristiche di estrema sensibilità della metodica di PCR Real Time, insieme alla precisione e versatilità di tale metodica, essa è impiegata come test di riferimento per l'identificazione di specie animali in matrici alimentari, sebbene l'applicabilità del

metodo richiede comunque una verifica quando esso è sviluppato secondo metodiche *in house*. Lo studio di fattibilità di applicazione di un metodo analitico deve necessariamente passare attraverso delle fasi le quali comprendono la progettazione e il disegno del test, la sua messa a punto e infine la validazione dello stesso, considerando quindi a priori tutti quei requisiti da soddisfare per la sua verifica. La validazione del metodo rappresenta quindi un aspetto fondamentale quando un nuovo saggio viene progettato e sviluppato per un determinato scopo. In particolare, secondo la ISO 17025:2005, è definita come la conferma attraverso l'esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti.

Tale verifica si applica quando i) il metodo analitico in esame non è normato e quindi sviluppato dal principio, ii) quando uno simile è già impiegato, ma lo si utilizza al di fuori del campo di applicazione per il quale lo stesso è previsto o iii) quando, ad esempio, lo si vuole migliorare o estendere. Nel caso di un metodo non diffuso, progettato e sviluppato dal laboratorio, esso deve tenere conto di tutte quelle variabili che potrebbero inficiare il test e la sua riuscita. Nel caso descritto, queste riguardano fondamentalmente la scelta del campione, che sia indicativo della totalità di esso e quindi rappresentativo; l'efficienza di estrazione del materiale genetico, il quale, come già detto, può risentire di notevoli variabili relative alla presenza di inibitori; la normalizzazione della concentrazione di acido nucleico, in quanto maggiore è la quantità di DNA nel campione, maggiore è il numero di inibitori presenti; il target genetico da idividuare come elemento caratteristico di quella data specie e che per esso uno specifico sistema sia progettato secondo accurati criteri scientifici dimostrabili. La validazione rappresenta dunque lo step finale del metodo di analisi scelto e prende in considerazione diversi parametri, la cui applicazione risulterà dipendente dagli obiettivi e dai risultati che si intende raggiungere. Essa non segue infatti dei principi guida ufficiali relativi al workflow da impiegare, ma solo delle indicazioni alla verifica mediante specificazione di alcune grandezze che definiscono la bontà del metodo analitico utilizzato, la cui scelta spetterà all'operatore. Esse sono rappresentate da: robustezza, precisione, specificità, limite di rilevabilità (LOD), limite di determinazione (LOQ), linearità e cut-off.

Robustezza. Tale parametro indica la capacità del metodo in esame di non risentire di piccole variazioni dei parametri sperimentali, quali lotto dei reagenti, pH o temperatura.

Precisione. Essa rappresenta il grado di concordanza tra i risultati ottenuti da una serie di prove indipendenti ottenute con lo stesso metodo e sotto precise condizioni sul medesimo campione. La precisione può essere espressa come misura della deviazione standard e include i concetti di ripetibilità e riproducibilità.

Specificità. La specificità è la capacità di un metodo di individuare selettivamente un determinato analita in presenza delle altre sostanze interferenti nel campione da analizzare.

Limite di Rilevabilità (LOD). Il limite di rivelabilità di una procedura analitica è la più piccola quantità di molecola bersaglio contenuta nel campione che può essere individuata in modo significativo impiegando il metodo scelto. Il LOD può essere calcolato mediante un approccio cosiddetto visivo e, quindi, determinato dall'analisi di campioni a concentrazione nota stimando il livello minimo (Ct) al quale il bersaglio produce un segnale di positività (almeno 10 replicati per ciascuna concentrazione) distinguibile dal rumore di fondo prodotto in assenza della molecola. Ulteriormente, è bene verificare tale limite mediante esecuzione del test con almeno 5 replicati per il più basso valore di concentrazione di bersaglio identificato. Ancora, può essere determinato dal rapporto tra deviazione standard della risposta e la pendenza della curva di calibrazione. In particolare viene espresso dalla formula 3DS/slope, dove DS rappresenta la deviazione standard del più basso valore di rilevazione calcolata su almeno 5 campioni privi dell'analita (Bianco). In pratica il LOD fornisce una stima di errore e imprecisione alle più basse concentrazioni di analita, delineando dunque di fatto, in alcuni casi, una sua possibile equivalenza al LOQ.

Limite di Determinazione o di Quantificazione (LOQ). Il limite di quantificazione di una procedura analitica è la quantità minima di molecola bersaglio contenuta nel campione che può essere determinata mediante l'impiego del metodo scelto. Come per il

LOD, esso può essere ricavato mediante approccio matematico o mediante l'analisi di campioni a concentrazione nota stimando il livello minimo (Ct) al quale il bersaglio può ancora essere quantificato con un livello accettabile di accuratezza e precisione (almeno 10 replicati per ciascuna concentrazione).

Linearità. La linearità di un metodo analitico è la capacità di produrre dei risultati direttamente proporzionali alla concentrazione di molecola bersaglio nel campione. Viene determinata effettuando un numero minimo di prove (circa 5) a concentrazioni di bersaglio incluse nell'intervallo di applicabilità del metodo con un minimo di 3 repliche per ciascuno. I risultati vengono plottati su un grafico per il calcolo di variabili statistiche quali coefficiente di regressione lineare, valore dell'intercetta y e indici di bontà dell'adattamento. Affinchè si possa assumere la linearità del metodo un valore maggiore di 0,980 del coefficiente di correlazione è auspicabile.

Cut-off. Nel caso in cui il test viene progettato allo scopo di identificare una specifica molecola bersaglio, risulta di fondamentale importanza determinare quale valore deve essere considerato come soglia di positività alla molecola ricercata. Occorre dunque stabile un valore critico detto valore soglia o di cut-off. In una Real Time PCR, il cut-off è rappresentato da quel ciclo di threshold al di sopra del quale il campione è considerato negativo per quel dato bersaglio. La frazione di campione certamente positivo che raggiunge la threshold di fluorescenza prima di tale ciclo è considerata come vero positivo. Similmente, la frazione di campione certamente negativo che raggiunge tale soglia prima di tale ciclo definisce un falso positivo. Se chiaramente un valore maggiore di ciclo soglia viene scelto come punto di cut-off, una maggiore frazione di campioni saranno catalogati come positivi, aumentando di contro la percentuale di possibili falsi positivi e diminuendo la specificità del saggio stesso. Un punto ottimale di cut-off corrisponderà dunque a quel valore che rappresenterà il giusto compromesso tra la percentuale di veri positivi e di falsi negativi, bilanciando dunque i requisiti di sensibilità e specificità del saggio. Per cui la sensibilità è indicata come la frazione di veri positivi che danno un risultato positivo ed è calcolata dividendo il numero di veri positivi sul totale di veri positivi e falsi negativi. La specificità è invece la frazione di campioni veri negativi che danno un risultato negativo ed è calcolata dividendo il numero di campioni

veri negativi sul totale dei campioni veri negativi e falsi positivi. Il calcolo pertanto del livello di cut-off tiene in considerazione il limite di rilevabilità del saggio (LOD) precedentemente descritto. In particolare, come già detto, esso è calcolato replicando diluizioni seriali del campione contenente il target da identificare e stimando il massimo valore di Ct al quale osserveremo ancora un segnale di positività. Nell'ultimo gruppo di replicati, quelli caratterizzati da una diluizione limite e quindi dal più basso livello di concentrazione di target, non sarà possibile osservare un valore di Ct per tutti i replicati saggiati, pertanto il test viene ripetuto solo per questi replicati al fine di una maggiore stima. Un metodo per il calcolo del cut-off, consiste nell'utilizzare il più alto valore di Ct rintracciabile in tale gruppo, e incrementarlo di un valore di 0,5-1 cicli per compensare le fluttuazioni di threshold tra le corse. Determinare un livello di cut-off per dati quantitativi acquista invece un significato nel caso in cui si faccia riferimento a specifici limiti di legge per i quali un saggio di tale tipo deve essere applicato in modo da rilevare anche i più piccoli livelli di molecola bersaglio nella matrice in esame. In particolare, il centro di referenza europeo, relativamente alla rilevazione di DNA equino nelle misture alimentari, ha chiarito come tale quantificazione va fatta secondo stima percentuale del contaminante presente sul totale della frazione animale, e non come percentuale di esso sulla base dell'intero alimento, in quanto tale procedura comporterebbe una sottostima dei positivi, poichè la componente animale in tali prodotti è spesso variabile al 4% - 5% del peso dell'alimento. Allo stato attuale, è possibile procedere con la definizione di un livello di cut-off fissato all'1% secondo le indicazioni previste dall' EURL-AP (70), il quale chiarisce tale valore come punto al confine tra la contaminazione accidentale e la frode alimentare. La positività al target contaminante è data dal confronto del suo valore di Ct nel campione testato, contenente la presunta mistura, con il campione di riferimento preparato e contenente l'1% del target oggetto del test. Se il valore del Ct del campione è uguale o inferiore al Ct del campione di riferimento, allora la frazione di massa è superata e il campione sarà considerato positivo. Tale livello soglia, benché emanato specificatamente per la rilevabilità di carne equina in un miscela carnea, è stato applicato sperimentalmente anche per l'identificazione delle altre specie animali, sebbene la percentuale di contaminazione animale in taluni casi potrebbe essere accidentalmente superiore senza di fatto concretizzare il reato di frode.

3.9 Microarray

La tecnologia del microarray nasce intorno agli anni ’90 essenzialmente grazie all’avvento delle tecniche di sequenziamento del DNA le quali iniziarono a fornire le prime informazioni genetiche e i cloni di centinaia di geni necessari allo sviluppo del metodo. Fondamentalmente la tecnica prevede la microibridazione per complementarietà di basi di un target di DNA con una specifica sonda molecolare e la conseguente registrazione e visualizzazione di un segnale (71). Nello specifico, un moderno DNA microarray è composto da un oligo di DNA complementare al target da individuare, detto probe, variabile da circa 20 a 5000 bp e localizzato fisicamente su di una superficie o su un supporto solido in vetro detto chip. Lo spazio in cui tale oligo risulta fisicamente localizzato nell’array è detto spot e rappresenta una posizione fissa e nota. Più in dettaglio, un array è costituito da un chip formato da migliaia di pozzetti, detti features, ciascuna delle quali contiene migliaia di probe complementari ad una sola sequenza e fissati su microscopici spot in una successione ordinata costituente una griglia (72). Dato l’elevato numero di sonde costituenti un array di questo tipo è possibile screenare un elevato numero di target simultaneamente e individuarli singolarmente in quanto immobilizzati in punti specifici e identificabili. Affinchè il segnale emesso sia di intensità tale da essere rilevato dallo strumento, ciascuna features è caratterizzata da un set di probe uguali e specifici per un target, che, in caso di positività, emetteranno un segnale complessivo frutto del contributo di fluorescenza emessa da ciascun target legato alla sonda, il quale permetterà il raggiungimento di una threshold di identificazione. Essenzialmente esistono due tipologie di DNA microarray, quelli a cDNA e quelli costituiti da oligo. I primi sono prodotti spottando sul supporto solido un cDNA a doppio filamento ottenuto da meccanismo di trascrizione inversa a partire da mRNA, clonaggio e amplificazione della ORF la quale rappresenta il motivo di legame del probe. Le maggiori limitazioni all’impiego di tali sonde derivano dall’elevato numero di nucleotidi costituenti la sonda stessa la quale è causa di alcune difficoltà non indifferenti nel settaggio della temperatura di melting ottimale all’ibridazione. Un secondo ostacolo all’impiego di tali probe deriva dai possibili fenomeni di cross-ibridazione di prodotti sequenza simili. Questi array sono spesso utilizzati in combinazione di due campioni, in cui ognuno risulta marcato con uno specifico fluoroforo e ibridati insieme su un singolo

supporto. Come risultato di ciò, ne deriva che la quantificazione dei target può essere solo di tipo relativa di un segnale fluorescente sull'altro. Gli array a oligo sono prodotti invece immobilizzando specifiche sequenze oligonucleotidiche su una superficie solida e facendo avvenire l'ibridazione solo per un singolo campione, determinando di fatto una quantificazione assoluta di target nel campione esaminato. Tale tecnica ha permesso notevoli passi nella comprensione dei fenomeni di espressione genica e, oggi, fornisce un valido tool per l'identificazione genetica di specie mediante screening di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) con un elevato grado di affidabilità. Il target di DNA viene infatti identificato in maniera ridondante all'interno dell'intero chip mediante il disegno di diversi oligo a singolo filamento (circa 22 nucleotidi in lunghezza) in grado di coprire per complementarietà di basi l'intera sequenza target oppure progettati di modo da identificare per l'appunto singoli polimorfismi di base (Figura 13). Risulta pertanto chiaro che l'applicazione di tale metodica richiede a monte la conoscenza della sequenza nucleotidica da identificare. Dal punto di vista metodologico, mentre l'oligo si trova fisicamente spottato su un supporto solido, il target da identificare viene marcato con molecole fluorescenti e aggiunto come soluzione nell'array per garantire l'ibridazione e permettere dunque la rilevazione del segnale grazie all'impiego di tali molecole fluorescenti (73). A seguito di ciò il chip viene lavato per rimuovere l'eccesso di target non ibridato e viene rilevato un segnale di avvenuta ibridazione grazie ad una scansione dei singoli spot delle features da parte di un lettore laser il quale ecciterà i fluorofori. L'intensità del segnale di fluorescenza, indice di positività del saggio a quel target, correla con la quantità di bersaglio presente nel campione testato. L'immagine digitale viene infatti processata in modo da convertire il segnale derivante da ciascuno spot in una lettura numerica.

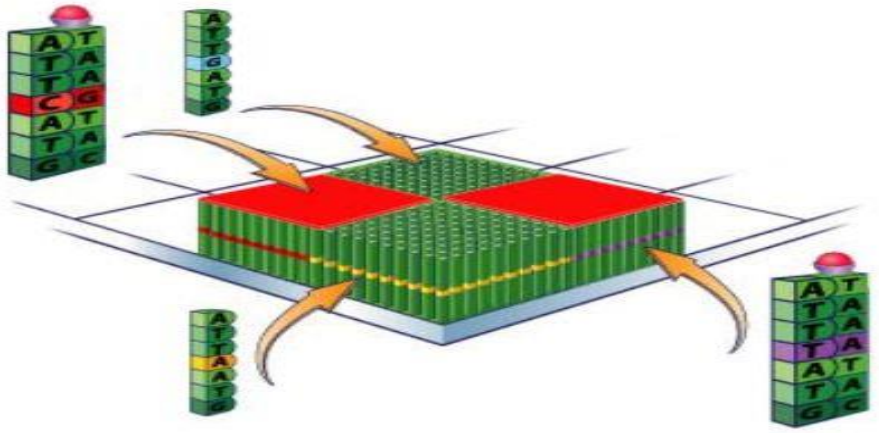


Figura 13. Rappresentazione schematica di un oligo array Affymetrix. Nello specifico gli oligo spottati differiscono per un polimorfismo di base. Il segnale risulta positivo per due di essi determinando un genotipo eterozigote.

Tale sistema è possibile innanzitutto rintracciando la specifica posizione di quel probe e associandola al segnale registrato, integrando le intensità di segnale registrate e stimando il valore di rumore di fondo. La lettura finale rappresenta quindi un valore integrato proporzionale alla concentrazione di target nel campione (74). Relativamente al settore della identificazione di specie, sebbene il sequenziamento genetico rappresenti il gold standard per la caratterizzazione della variabilità, l'applicazione dei DNA microarray rappresenta un approccio più semplice, rapido e automatico che consente l'analisi di un numero elevato di polimorfismi simultaneamente, trovando applicazione soprattutto in quelle fasi di screening iniziale per la valutazione della presenza/assenza della specie. Oltretutto, trattandosi di probe oligonucleotidici di breve lunghezza, permette l'applicazione su frammenti di target di DNA di ridotte dimensioni, derivanti ad esempio da degradazione come nel caso di alimenti processati o sottoposti a trattamenti distruttivi. L'amplificazione di un frammento target in un genoma estremamente compromesso risulterà statisticamente favorita per piccole porzioni di esso, sufficienti di fatto alla loro ibridazione su un sistema di tale tipo. Tale tecnica a fronte dei suoi vantaggi, non è però esente da ostacoli alla sua applicazione. Innanzitutto errori derivanti dalla fase di ibridazione possono inficiare il risultato, in quanto dipendente da numerose variabili quali tempo, temperatura ed esposizione alla luce. Per quanto concerne l'analisi dei dati, una tale complessità può determinare difficoltà relate al numero di spot luminosi registrati, spesso incrementati se i saggi sono ripetuti in doppio ai fini di una possibile validazione.

Ad elevate concentrazioni infatti, l'array può facilmente andare incontro a saturazione del segnale, rendendo di fatto impossibile l'analisi. Per tali motivi una quantificazione può essere determinata solo per un range limitato di valori di target in quel campione, al di sopra del quale risulterà di difficile esecuzione. Da tenere in considerazione, soprattutto nell'analisi di genomi complessi quali quelli di mammifero, è la possibilità di cross-ibridazione di un target su un diverso probe, il quale determinerà una falsa positività a quella specie dovuta alla presenza di sequenze omologhe tra i target di DNA saggiati. Per tale motivo, un sistema di array basato su questo approccio deve essere dotato di estrema sensibilità per rintracciare il più basso numero di target presente nel campione e al contempo di specificità che ne consenta l'identificazione del solo bersaglio ricercato.

4.0 Microsatelliti

Come già disusso nel capitolo 1.6, la possibilità di identificare un dato prodotto finito relativamente alla sua origine e ricostruirne a ritroso la sua storia è strettamente correlata all'adozione di un adeguato sistema di identificazione che ne garantisca l'efficacia. L'impiego dei comuni sistemi identificativi permette di estrapolare una serie di utili informazioni, sebbene a causa di episodi di natura casuale o dolosa, questo tipo di sistema non è sempre in grado di garantire l'identità del soggetto. In questi casi l'analisi molecolare e, precisamente la tracciabilità genetica, rappresenta quel sistema in grado di dare veridicità assoluta alle informazioni che accompagnano quel dato animale, integrando e verificando dunque i sistemi ordinari. La tracciablità genetica pone le sue basi sul presupposto che non ci sono individui (ad eccezione dei gemelli omozigoti) che condividano esattamente lo stesso genoma. In una popolazione, infatti, coesisteranno generalmente forme alternative di uno stesso allele, chiamati polimorfismi, generate da variazioni ereditarie di una sequenza di DNA. Dal momento che la frequenza di un polimorfismo in una popolazione è, per definizione, superiore all'1%, non si tratta di mutazioni in senso stretto. Il metodo di caratterizzazione del profilo genotipico permette quindi di ottenere un'impronta digitale dell'animale a livello genetico, indipendentemente da caratteri fenotipici o da altre tecniche identificative. Il sistema prende il nome di DNA fingerprinting e si basa sulla determinazione delle caratteristiche molecolari di un

pannello di specifici marcatori genetici opportunamenti selezionati per quella specie animale. Tali marcatori genetici sono definiti microsatelliti o short tandem repeats (STR), ovvero regioni di DNA non codificanti, uniformemente distribuite nei genomi eucariotici, che mostrano una grande variabilità nel numero di corte sequenze ripetute in tandem; la lunghezza dell'unità ripetitiva è compresa tra 2 e 5 bp, con una lunghezza totale dell'intera sequenza da alcune decine fino a poche centinaia di basi (75). La variazione dei singoli genomi a livello dei microsatelliti si deve al diverso numero di unità ripetute dei vari alleli presenti nella popolazione (Figura 14). Tali differenze, derivano dal fatto che a livello delle STR, la frequenza di scambio genico è molto elevata, circa 10 volte la frequenza di ricombinazione omologa dovuta ai crossing-over al momento della meiosi. Questo fenomeno, definito crossing-over ineguale o NAHR porta a una ricombinazione tra due siti non omologhi e viene reso possibile proprio dalla presenza di sequenze ripetute, non equivalenti, in alcune regioni di DNA. Ne consegue che, una copia di una sequenza ripetuta appartenente ad un determinato cromosoma si allinea erroneamente e ricombina con una copia diversa della ripetizione sul cromosoma omologo. L'avvenuta ricombinazione permette ad un cromosoma ricombinante di avere una delezione e all'altro un'inserzione; un cromosoma avrà dunque un numero maggiore di ripetizioni e l'altro un numero minore.

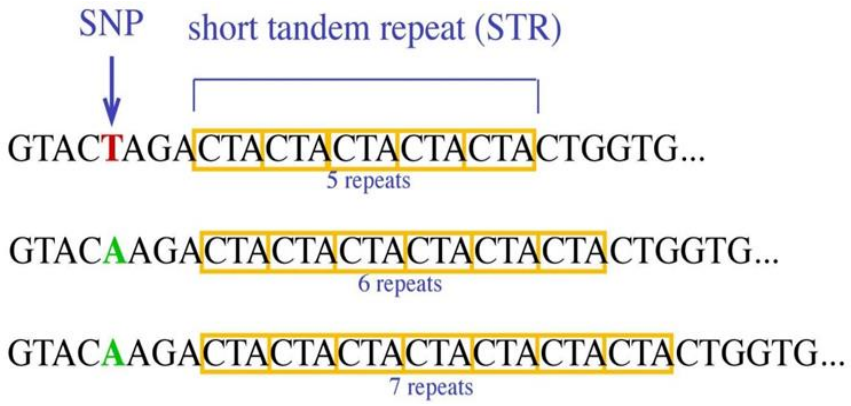


Figura 14. Rappresentazione grafica di marcatori STR e SNP.

A questo fenomeno si include anche quello che viene definito scivolamento replicativo o strand slippage (76), ovvero appaiamenti errati intrafilamento che si possono generare a

livello di tali regioni altamente ripetute a causa del normale distacco, in fase replicativa, della DNA polimerasi dalla forca di replicazione. Il filamento di nuova sintesi può quindi scivolare indietro di un'unità ripetitiva (backward slippage), formando una forcina (loop out) contenente l'unità ripetitiva "scivolata", o ancora può accadere che sia il filamento stampo a scivolare in avanti (forward slippage), formando una forcina contenente la tripletta. Nel backward slippage la DNA polimerasi, tornando indietro, copia nuovamente la sequenza già replicata che ora si trova all'interno della forcina. Questo fenomeno genera dunque una inserzione e quindi un DNA con un maggiore numero di ripetizioni, a differenza del forward slippage che, invece, è causa di una delezione. Normalmente, tali anomalie sono revertite dai sistemi di riparo del DNA, ma quando tali sistemi non sono funzionanti o meno efficienti, la frequenza di queste variazioni aumenta notevolmente. A causa dunque dei fenomeni di crossing-over ineguale e di strand slippage le dimensioni delle STR sono altamente polimorfiche, il che comporta una elevata variabilità individuale. L'alta variabilità, a livello di questi loci, rende le STR particolarmente utili per l'identificazione genetica poichè esiste una infinitesima probabilità che due individui abbiano la stessa combinazione di varianti alleliche, la quale cresce all'aumentare dei loci testati. Ne deriva dunque che mediante il confronto genetico tra il campione in esame, prelevato dall'animale in vita (prelievo ante mortem) ed il campione post mortem, da cui si presuma esso derivi, campionato ad esempio al punto vendita o in qualsiasi altro punto della filiera, è possibile verificarne la corrispondenza. La metodica può inoltre essere applicata anche nell'identificazione di razza o gruppo familiare e persino su alimenti sottoposti a trattamenti trasformativi derivanti dalla sua lavorazione, in quanto ha il vantaggio di essere più tollerante all'uso di DNA degradato dato che l'analisi di tali marcatori è effettuata su frammenti inferiori alle 500 bp. Oltretutto è in grado di discriminare profili genetici misti quando la componente carnea all'interno del prodotto proviene da più soggetti, permettendo quindi la discriminazione per esempio di una partita da un'altra, fintantochè un profilo di comparazione è disponibile per ogni lotto (77). Il metodo di genotracciabilità attualmente impiegato è basato sulla amplificazione selettiva di questi marcatori microsatelliti usando, come oligonucleotidi di innesco, primers marcati con coloranti fluorescenti e complementari alle regioni fiancheggianti le STR stesse. I prodotti risultanti dall'amplificazione sono poi separati per elettroforesi

capillare in continuo mediante sequenziatori automatici per determinare le varianti alleliche presenti nei loci presi in considerazione. Nell'elettroforesi capillare i frammenti di DNA amplificati vengono iniettati in un tubo capillare e vengono separati per migrazione indotta dall'applicazione di un campo elettrico. I vari frammenti vengono poi rilevati, man mano che attraversano il capillare, da un sistema che sfrutta la fluorescenza dei primers. Nella porzione terminale del capillare, i frammenti di DNA sono infatti colpiti da un raggio laser che eccita le molecole fluorescenti con cui sono stati marcati i primers. Ciascuno dei fluorocromi, viene quindi eccitato e, come conseguenza di ciò, emetterà luce ad una diversa lunghezza d'onda, specifica per il fluorocromo impiegato. Le emissioni fluorescenti sono separate in base alla lunghezza d'onda e un software, poi, convertirà infine il pattern di emissioni in una serie di picchi colorati (elettroferogramma), corrispondenti ognuno ad un preciso allele dei vari loci. I picchi allelici sono identificati da un numero corrispondente al peso molecolare il quale dipenderà dal numero di ripetizioni. Tali dimensioni sono calcolate dal software utilizzando come riferimento uno standard di frammenti di DNA a dimensioni note, aggiunto contestualmente al campione e marcato con un fluorocromo differente. Questa metodica, eseguibile in singolo o in multiplex, consente quindi ai diversi frammenti di essere amplificati e di correre poi simultaneamente. L'analisi quindi del fingerprinting tramite la tipizzazione STR ha il vantaggio di essere rapida ed efficace, coniugando sensibilità e alto potere discriminante in modo da permettere il suo impiego anche su quantità minime di campione e di tracciare e/o identificare un individuo in maniera univoca e con un margine di errore pressochè trascurabile. Tale tecnica, insieme a quella del DNA Barcoding, rappresenta il gold standard in fatto di identificazione genetica. Sebbene infatti il DNA Barcoding fornisca una risposta generica in merito all'appartenenza di un dato genoma ad una precisa specie, l'analisi dei microsatelliti di fatto ne assegna l'identità, che ci consenitrà di distinguerla da un altra della medesima specie.

4. OBIETTIVO

4.1 Obiettivo del lavoro

A causa delle prime crisi del settore alimentare contraddistinte da eventi di forte risonanza mediatica quali BSE, contaminazioni da diossina e, più recentemente, la manipolazione fraudolenta di preparati alimentari a base di carne, la tutela della salute pubblica è divenuta oggi un elemento critico sulla quale il legislatore ha rivolto notevoli attenzioni. La libera circolazione di alimenti, dovuta all'ormai sempre più incalzante fenomeno della globalizzazione, è oggi uno dei principi cardini del mercato comunitario ed è per tale motivo che questi episodi hanno influenzato negativamente i mercati europei e messo in evidenza le fragilità del sistema agroalimentare da un punto di vista del controllo e della sicurezza. È in tale clima che nasce nel consumatore un forte effetto di sfiducia e disorientamento nei confronti del sistema alimentare e che però, al contempo, ne crea i presupposti per dare una decisa risposta alla crisi del settore mediante adozione di specifiche norme da parte della Comunità Europea. L'esigenza dunque di implementazione di un efficiente sistema di tracciabilità dei prodotti di origine animale è divenuta cruciale per garantire le scelte del consumatore il quale manifesta una sempre più crescente ricerca di sicurezza derivata da una maggiore informazione e consapevolezza. Per mantenere dunque un elevato standard di qualità e sicurezza lungo l'intera filiera alimentare, sono necessari efficienti sistemi di monitoraggio a garanzia di una produzione alimentare trasparente ed esente da frodi. L'identificazione delle specie presenti in una mistura alimentare rappresenta oggi uno dei maggiori problemi connessi con l'analisi merceologica di tali prodotti, in quanto la miscelazione di specifici prodotti è consentita, nei limiti di legge, purché le diverse specie costituenti la miscela siano dichiarate. A causa della grande variabilità dei prodotti alimentari esistenti sul mercato, si rende quindi necessario un controllo accurato degli ingredienti dichiarati, mirato ad accertare l'eventuale presenza di contaminanti, in quanto una specie ad alto costo può spesso essere fraudolentemente sostituita da una a basso costo o di quest'ultima addizionata. Le adulterazioni rappresentano oggi un fenomeno estremamente diffuso e difficile da arginare, spinto anche dal notevole incremento della commercializzazione di

tutti quei prodotti processati e immediatamente disponibili al consumo, quali insaccati, conserve, precotti e surgelati, sia carnei che non, nei quali, a causa del processo trasformativo subito, l'analisi morfologica non è più in grado di fornire un valido ausilio alla verifica, rendendo di fatto impossibile l'identificazione delle specie costituenti quel prodotto e favorendo quindi il comportamento illecito. Per garantire quindi la fedeltà di un prodotto alimentare e l'applicazione di misure correttive, laddove richiesto dalle normative europee, è necessario l'applicazione di metodiche identificative robuste in grado di soddisfare tali requisiti. Oggi, la metodica analitica di scelta per l'identificazione di specie negli alimenti di origine animale si basa sull'impiego della Real Time PCR (78) in quanto sensibile, specifica, dotata di un ampio range di misurazione quantitativa oltre che essere affidabile e ripetibile per quanto concerne gli alimenti trasformati, di complessa composizione e trattati in genere in maniera estrema a causa del loro processo lavorativo. Tale tecnica rappresenta oggi il gold standard del settore, congiuntamente all'applicazione di altre metodiche identificative quali il sequenziamento del DNA, chip di microarray e la valutazione dei polimorfismi del DNA. Come gia definito, il genoma mitocondriale rappresenta la molecola che meglio si presta alle analisi identificative in quanto dotata di caratteristiche tali da presentare innumerevoli vantaggi se comparata alla controparte nucleare. Una su tutte, la sua presenza in multiple copie la quale incrementa la probabilità di rintracciare una specifica sequenza nucleotidica anche se presente a basse concentrazioni unitamente alla probabilità che tale molecola sia integra e non interessata da degradazione anche a seguito di trattamenti termici. Di contro, la componente nucleare rappresenta la molecola di scelta per quelle analisi di tracciabilità molecolare ai fini identificativi di un dato animale per garantirne la sicurezza della catena almentare in ogni suo punto.

Pertanto, gli obiettivi del presente lavoro sono stati:

-Validazione della metodica di Real Time PCR come strumento di identificazione di specie animale in matrici alimentari a base di carne sottoposte o meno a processi trasformativi. Il metodo identificativo è stato validato presso il Laboratorio di Tecnologie Diagnostiche Innovative dell'istituto Zooproofilattico Sperimentale di Palermo,

specificatamente per le specie bovino (*Bos taurus*), ovino (*Ovis aries*), suino (*Sus scrofa*) ed equino (*Equus caballus*) mediante la messa a punto della suddetta tecnica.

-Progettazione, disegno e sviluppo di un saggio di Multiplex PCR Real Time specificatamente per le specie bovina, ovina e suina mediante impiego di sonde molecolari di tipo TaqMan MGB.

- Applicazione di un saggio di chip array per le citate matrici alimentari da impiegare come tecnica di screening qualitativa ai fini identificativi.

-Implementazione di un sistema di tracciabilità genetica basato sulla tipizzazione STRs per l'identificazione di capi bovini e la verifica della corrispondenza genetica mediante confronto tra il campione prelevato in vita e il medesimo a differenti intervalli di tempo o con quello post mortem.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Preparazione dei campioni

Per la validazione del metodo identificativo sono stati utilizzati materiali di riferimento certificati dai servizi veterinari relativamente alle specie bovina, ovina, suina ed equina rappresentati da campioni di tessuto muscolare compatibile al loro uso nel settore alimentare. Le specie in questione sono state campionate e miscelate tra di loro accuratamente a differente rapporto percentuale in peso utilizzando dapprima un mortaio e poi un sistema automatico che si è avvalso dell'impiego di un omogenizzatore del tipo Stomacher. Specificatamente, come stabilito dal protocollo operativo EURL (79), sono state create delle miscele di riferimento in un peso finale di 100 g, utilizzando come riferimento la soglia minima dell 1% richiesta per definirne la positività alla frazione di massa (Tabella 3). Le miscele sono state cosi preparate seguendo una logica di natura commerciale-economica, in quanto l'illecito, spesso messo in atto per tali motivi, interesserà la sostituzione della componente di maggiore valore con quella di minore. Tra gli altri, l'analisi dell'inquinante bovino come tessuto muscolare in sé in un preparato a base di carne suina, difficilmente troverà riscontro nella pratica della frode e pertanto non considerato per la realizzazione di questa fase di lavoro. È pur vero però, che l'aggiunta di prodotti di scarto seppure di animali ad alto valore economico ad alimenti di più basso valore, costituisce comunque una frode di sostituzione e che, sebbene non investigata specificatamente in dettaglio in questa fase, rientra comunque nel campo di applicazione della metodica di screening in microarray trattata successivamente.

	Matrice 1 (% p/p)	**Matrice 2 (% p/p)**
Mistura 1	Carne Equino 1%	Carne Bovino (99%)
Mistura 2	Carne Suino 1%	Carne Bovino (99%)
Mistura 3	Carne Ovino 1%	Carne Bovino (99%)
Mistura 4	Carne Ovino 1%	Carne Suino (99%)

Tabella 3. Schema di preparazione delle misture carnee. I valori percentuali, espressi come rapporto peso/peso, indicano i grammi di componente di Matrice 1 miscelati alla componente Matrice 2.

Per compensare alcuni effetti di sottostima dell'inquinante dovuta alla miscelazione dei campioni di riferimento, si è voluto creare dei pool di DNA a partire dai singoli estratti per ciascuna specie, rispettando le medesime proporzioni e precisamente (Tabella 4):

	Matrice 1 (% v/v)	**Matrice 2 (% v/v)**
DNA Mix 1	DNA Equino 1%	DNA Bovino (99%)
DNA Mix 2	DNA Suino 1%	DNA Bovino (99%)
DNA Mix 3	DNA Ovino 1%	DNA Bovino (99%)
DNA Mix 4	DNA Ovino 1%	DNA Suino (99%)

Tabella 4. Schema di preparazione delle miscele di DNA a partire dai relativi estratti dai campioni puri. I valori percentuali, espressi come rapporto volume/volume, indicano i microlitri di DNA di Matrice 1 miscelati alla componente DNA di Matrice 2.

Sono stati inoltre analizzati 25 campioni commerciali, ufficialmente prelevati dagli organi competenti in occasione di attività di indagine sul territorio per la prevenzione delle frodi e inviati presso i laboratori di Biologia Molecolare dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Palermo per espletarne le analisi di screening qualitativo utilizzando chip di DNA array e, in caso di positività, saggiati quando possibile con la metodica di Real Time PCR per la valutazione quantitativa. I campioni di riferimento puri e miscelati, e quelli commerciali, sono stati altresì utilizzati come riferimento per l'implementazione del sistema di Multiplex PCR Real Time. Infine, su richiesta dei servizi veterinari, sono stati analizzati 112 campioni di bovino provenienti da 8 differenti aziende del territorio per verifica di identità genetica mediante DNA fingerprinting. Tali campioni risultavano costituiti da tessuto muscolare e da campioni ematici, prelevati direttamente in azienda (ante-mortem) o al mattatoio in fase post-mortem e analizzati per la corrispondenza genetica con i rispettivi campioni ematici prelevati dal medesimo animale in tempi differenti o quando esso era ancora in vita al fine di accertare se eventuali irregolarità erano gia in atto. Le tabelle 5 e 6 riportano le specifiche dei campionamenti per le tipologie di analisi eseguite.

Progressivo	Matrice	Specie Dichiarata	Provenienza
1	Tortelloni al ripieno di carne	SUINO	Catania
2	Tortelloni al ripieno di carne	SUINO	Catania
3	Ragù di carne	BOVINO/SUINO	Catania
4	Ragù di carne	BOVINO/SUINO	Catania
5	Preparato a base di carne	SUINO	Catania
6	Carne in scatola	BOVINO	Catania
7	Hamburger	BOVINO	Catania
8	Salame	SUINO	Catania
9	Salame	SUINO	Catania
10	Carne macinata	BOVINO	Ragusa
11	Salsicce fresche	SUINO	Ragusa
12	Carne macinata	BOVINO	Palermo
13	Salsiccia	SUINO	Ragusa
14	Carne macinata	BOVINO	Palermo
15	Carne in scatola	BOVINO	Catania
16	Hamburger	BOVINO	Catania
17	Ragu di carne	BOVINO/SUINO	Ragusa
18	Carne in scatola	BOVINO	Catania
19	Tortellini carne	SUINO	Palermo
20	Tortellini carne	BOVINO/SUINO	Ragusa
21	Cannelloni ragu	BOVINO/SUINO	Palermo
22	Hamburger	BOVINO	Palermo
23	Hamburger	BOVINO	Catania
24	Salsiccia	SUINO	Ragusa
25	Preparato a base di carne	SUINO	Catania

Tabella 5. Specifiche dei prodotti commerciali campionati dall'Autorità Giudiziaria per le esecuzioni delle analisi di identificazione di specie. Il luogo di provenienza è riferito all'area geografica in cui l'attività commerciale risiede.

Nr. Campioni	Matrice Riferimento (n)	Matrice Controllo (n)	Località	Tipologia Controllo	Luogo Campionamento
14	Emosiero (7)	Muscolo (7)	Catania	Post-mortem	Mattatoio
10	Emosiero (5)	Emosiero (5)	Ragusa	Ante-mortem	Azienda
12	Sangue Intero (6)	Emosiero (6)	Ragusa	Ante-mortem	Azienda
16	Emosiero (8)	Muscolo (8)	Ragusa	Post-mortem	Mattatoio
14	Emosiero (7)*	Emosiero (7)	Palermo	Ante-mortem	Azienda
16	Sangue Intero (8)*	Muscolo (8)	Catania	Post-mortem	Mattatoio
18	Emosiero (9)	Emosiero (9)	Catania	Ante-mortem	Azienda
12	Sangue Intero (6)	Emosiero (6)	Ragusa	Ante-mortem	Azienda

Tabella 6. Specifiche dell'attività di campionamento dei Servizi Veterinari relative alle attività di verifica di tracciabilità genetica. Matrice di Riferimento si riferisce al campione prelevato in azienda ante-mortem ovvero disponibile presso i laboratori IZS a seguito di precedenti attività di controllo (*). Matrice di Controllo si riferisce al campione prelevato in fase post-mortem al mattatoio o in vivo, in tempi differenti, per la verifica di accertamenti *in itinere.* Luogo di Campionamento si rifierisce al luogo di prelievo della Matrice di Controllo.

5.2 Estrazione del DNA

L'estrazione del materiale genetico è stata condotta per ciascuna matrice in esame in doppio e mediante l'applicazione di 2 differenti metodi, manuale e automatizzato. Il primo ha previsto l'impiego del kit commerciale DNeasy Mericon Food Kit (Qiagen) il quale risulta raccomandato dalla ditta produttrice per l'estrazione di DNA genomico da alimenti sottoposti a trattamenti estremi quali pastorizzazione, radiazioni, variazioni di pH, cottura e, per i quali, il DNA si trova generalmente costituito da frammenti variabili da 150 bp a 250 bp. Tale kit usa un protocollo modificato per l'estrazione di materiale genetico mediante impiego del CTAB, e dunque idoneo per le matrici commerciali, anche se applicabile anche agli alimenti non trattati. Specificatamente esso ha previsto i seguenti step.

1. Con una spatola è stata prelevata l'intera componente interna dell'alimento a base di ripieno e invece tagliate delle piccole porzioni degli altri campioni in modo da realizzare più prelievi significativi. Nel caso di alimenti solidi o semi-solidi, aliquote rappresentative di materiale alimentare, prelevate su più punti, sono state pestate meccanicamente e aggiunte poi in una busta con filtro per essere ulteriormente degradate

in un omogenizzatore di tipo Stomacher. Per gli alimenti a base di ripieno, l'intero contenuto è stato omogenizzato al medesimo modo.

2. Da ciascun campione omogenato, sono stati pesati 200 mg e aggiunti in tubo da microcentrifuga da 2 ml, addizionato di 1 ml di Food Lysis Buffer e 2.5 µL di Proteinase K.
3. I campioni sono stati quindi incubati a 60°C per 30 minuti in costante agitazione su un termo mixer settato a 1000 rpm.
4. Dopo l'incubazione, sono stati raffreddati a temperatura ambiente (15-25°C) ponendoli in ghiaccio in modo da incrementare la precipitazione degli inibitori.
5. I campioni sono stati quindi centrifugati a 2500xg per 5 minuti a temperatura ambiente. Al termine di tale step si è assistiti, per taluni campioni, alla formazione di tre fasi, di cui quella superiore caratterizzata da un film semi-solido. Secondo il protocollo, si è proceduti bucando tale film con un puntale e prelevando la fase intermedia chiara.
6. Sono stati dunque aliquotati, per ciascun campione in esame, 500 µL di cloroformio in un nuovo tubo da microcentrifuga da 2 ml.
7. Dal supernatante ottenuto dallo step 5 sono stati trasferiti 700 µL nel tubo da microcentrifuga contenente il cloroformio, prestando attenzione a non interferire con il precipitato al fondo. In questa fase, per alcuni campioni, non si è riuscito ad ottenere un volume di surnatante idoneo, per cui, in accordo con il protocollo operativo del kit, sono stati combinati e miscelati i surnatanti di due diverse estrazioni del medesimo campione al fine di ottenere il volume di 700 µL richiesto. Tale incoveniente si crea dall'assorbimento dei reagenti da parte del materiale alimentare.
8. Dopo agitazione per 15 secondi, si è centrifugato il campione a 14000xg per 15 minuti a temperatura ambiente.
9. 1 ml di Buffer PB è stato aliquotato in un nuovo tubo da microcentrifuga da 2 ml e aggiunto con 250 µL della fase acquosa ottenuta dallo step 8.
10. Di questa soluzione, 600 µL sono stati aggiunti alla colonna QIAquick posizionata in tubo di collezione da 2ml.
11. Si è proceduti con una centrifugazione a 17900xg per 1 minuto a temperatura ambiente e scartato ciò che è fluito attraverso la colonna, riusando il medesimo tubo di collezione.
12. Sono stati ripetuti gli step 10 e 11 per il campione rimasto.

13. Alla colonna sono stati aggiunti 500 µL di buffer AW2 (Buffer di lavaggio) e centrifugata a 17900xg per 1 minuto a temperatura ambiente. Ancora, è stato scartato cio che è fluito attraverso la colonna e il tubo riutilizzato per una nuova centrifugazione a 17900xg per 1 minuto per asciugare la membrana della colonna.
14. La colonna è stata trasferita in un nuovo tubo da 2 ml e addizionata di 100 µL di buffer di eluizione EB.
15. La colonna è stata lasciata incubare 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugata a 17900xg per 1 minuto per operare l'eluizione del DNA.
16. Il DNA eluito è stato trasferito a -20 °C sino al suo uso.

Per le matrici pure e per quelle a differente percentuale di contaminante, create per miscelazione delle prime, è stato scelto il metodo di estrazione manuale e in particolare l'impiego del kit PureLink Genomic DNA (Thermofisher). Tale sistema, è stato inoltre utilizzato per l'estrazione del DNA da tessuto muscolare e dai campioni ematici bovini (emosiero e sangue intero), entrambi giunti nei laboratori per le analisi di tracciabilità genetica. Il kit sfrutta le proprietà dell'acido nucleico di legare una membrana di silice e utilizza la tecnologia delle resine a scambio ionico per ottenere un DNA puro dalle 20 Kb alle 50 Kb. L'estrazione, in doppio per ciascun campione, è stata condotta applicando le seguenti fasi.

1a. Dal campione di sangue coagulato, si è prelevata una semiluna delle dimensioni approssimative di 2-3 mm e posta in un tubo sterile da microcentrifuga da 2 ml.
1b. Dai campioni di sangue intero, 200 µL di campione sono stati posti direttamente in un tubo sterile da microcentrifuga da 2 ml.
1c. Dalle specie pure, prima della miscelazione, un'aliquota è stata isolata e omogenizzata accuratamente. Da essa, 200 mg di tessuto sono stati pesati e posti in tubo da microcentrifuga da 2 ml. La restante parte è stata congelata.
1d. Da ciascuna miscela carnea creata, l'intera aliquota rimanente è stata prelevata e posta in due buste con filtro per omogenizzatore per operare la degradazione del campione in un omogenizzatore di tipo Stomacher. Dagli omogenati ottenuti sono stati pesati 200 mg di tessuto e posto in tubo da microcentrifuga da 2 ml. La restante parte è stata congelata.

1e. Dai campioni di tessuto muscolare, un'aliquota è stata prelevata e omogenizzata meccanicamente. Sono stati dunque pesati 200 mg di tessuto e posti in tubo da microcentrifuga da 2 ml. La restante parte è stata congelata.

2. Ai campioni sono stati aggiunti 20 µl di proteinasi K (20 mg/ml) e 180 µL e 200 µL di buffer di digestione rispettivamente per i campioni ematici e per le misture carnee, le specie pure e per il tessuto muscolare, al fine di immergere completamente le matrici nella soluzione di lisi.

3. Dopo agitazione in vortex per qualche secondo, in modo da omogenare il campione nella soluzione, questo è stato incubato a 55°C per 30 minuti.

4. Trascorso tale periodo si è proceduto alla centrifugazione a 15000xg per 3 minuti a temperatura ambiente e il supernatante è stato trasferito in un nuovo tubo sterile.

5. Sono stati quindi aggiunti 200 µl di Etanolo e 200 µl di Binding Buffer per permettere al materiale genetico di precipitare e legarsi alla membrana in silice della colonnina.

6. Dopo aver omogenato nuovamente per qualche secondo, il lisato è stato trasferito nelle colonnine poste all'interno di un tubo di collezione e centrifugato a 10000xg per un minuto a temperatura ambiente.

7. L'eluato è stato scartato e la colonnina posta in un nuovo tubo di collezione.

8. Alla colonna sono stati aggiunti 500 µl del Buffer di Lavaggio e centrifugata a 10000xg per un minuto a temperatura ambiente.

9. L'eluato è stato scartato e la colonnina trasferita in un nuovo tubo di collezione sterile.

10. Alla colonna sono aggiunti nuovamente 500 µl del Buffer di Lavaggio e centrifugata a 15000xg per 3 minuti a temperatura ambiente.

10. L'eluato è stato scartato e la colonnina trasferita questa volta in un nuovo tubo da microcentrifuga da 2 ml.

11. Alla colonna sono stati aggiunti 100 µL del Buffer di Eluizione (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA) per tutte le matrici estratte. Dopo incubazione di 1 minuto a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati a 15000xg per 1 minuto.

12. Il DNA eluito è stato quindi conservato a -20°C fino all'utilizzo.

Il metodo automatizzato è stato applicato per l'estrazione di DNA dai soli campioni ematici (sangue intero) per le analisi di genotracciabilità. L'applicabilità di tale metodo è stata saggiata al fine di verificare la comparabilità qualitativa e quantitativa con il

corrispettivo metodo manuale, in quanto più rapido e altamente processivo. Il sistema automatizzato impiegato è il NucliSENS EasyMag (Biomerieux) e permette l'estrazione di DNA mediante l'utilizzo di biglie magnetiche in grado di legare per affinità le molecole di acido nucleico estratto e, in seguito, purificarlo dai residui di estrazione mediante una serie di lavaggi. Il sistema è in grado di processare 24 campioni simultaneamente in appena 1 ora e prevede due tipologie di lisi del campione, *on-board* e *off-board*. Nel caso specifico è stata selezionata la modalità di lisi *off-board*, Workflow di tipo 3. In dettaglio, la procedura ha previsto le seguenti fasi.

1. Un volume di 300 µL di sangue intero è stato aggiunto ad un tubo da microcentrifuga da 2 ml e miscelato con 900 µL Red Cell Lysis Buffer (Qiagen).
2. Il campione è stato quindi vortexato vigorosamente e incubato a temperatura ambiente per 1 minuto per operare la lisi dei globuli rossi.
3. Successivamente è stato centrifugato a 14000xg per 20 secondi per pellettare la componente leucocitaria.
4. Il surnatante è stato quindi scartato con una pipetta o versato accuratamente, lasciando approssimativamente un volume di circa 10 µL al fondo del tubo.
5. Il campione viene vortexato nuovamente per operare il distacco e la risospensione del pellet cellulare dal fondo del tubo.
6. Sullo strumento, dopo la registrazione di ciascun campione e impostata la tipologia di lisi *off-board*, vengono caricate 3 vaschette, ciascuna costituita da 8 concavità che fungeranno da recipienti per il campione. Avviato il sistema, esso dispenserà 2 ml di Buffer di Lisi in ciascun recipiente.
7. Il campione dello step 5, viene quindi interamente aliquotato all'interno delle vaschette, miscelato accuratamente e incubato 10 minuti a temperatura ambiente per operare la lisi cellulare.
8. La fase successiva ha previsto l'aggiunta di una soluzione di Biglie magnetiche di silice, fornite dal kit, opportunamente preparate in rapporto 1:1 (volume/volume) con il Buffer di Estrazione 3. Specificatamente, 550 µL di biglie sono state miscelate accuratamente con 550 µL di Buffer 3, necessari all'estrazione di 24 campioni.

9. Di questa soluzione, 125 µL sono stati dispensati in una piastra da 96 pozzetti e, al termine della fase di incubazione, 100 µL di essi, sono stati pipettati in ciascun recipiente delle vaschette.
10. La soluzione così formata (Campione ematico/Buffer di Lisi - Biglie di Silice/Buffer 3) è stata lasciata ad incubare per 10 minuti a temperatura ambiente per permettere alle biglie magnetiche di legare il DNA in soluzione.
11. Al termine, ciascuna vaschetta è stata alloggiata nello strumento e, dunque, operata la purificazione del materiale genetico estratto.
12. Il DNA è stato poi prelevato da ciascun alloggiamento delle vaschette per essere trasferito in tubi da microcentrifuga da 2 ml e posto a -20°C fino all'utilizzo.

Uno schema riassuntivo dei metodi estrattivi applicati alle specifiche matrici è riportato in Tabella 7.

Matrice	Metodo di Estrazione Manuale	Metodo di Estrazione Automatizzato
Sangue Intero	PureLink Genomic DNA	NucliSENS easyMag
Emosiero	PureLink Genomic DNA	-
Muscolo	PureLink Genomic DNA	-
Prodotti Commerciali	DNeasy Mericon Food Kit	-
Misture Carnee	PureLink Genomic DNA	-
Specie Pure	PureLink Genomic DNA	-

Tabella 7. Schema riassuntivo delle metodiche di estrazione manuali e automatizzate applicate alle matrici impiegate.

5.3 Quantificazione del DNA

La concentrazione di DNA relativamente ai campioni estratti secondo le modalità descritte sopra, è stata valutata mediante applicazione della tecnica di spettrofotometria UV e di un saggio fluorescente. Nel primo caso, è stato utilizzato lo strumento Nanodrop 1000 (Thermo), il quale fornisce un dato quantitativo attraverso la misurazione del valore di assorbanza del DNA alla lunghezza d'onda di 260 nm. Il medesimo strumento consente anche una stima qualitativa dell'estratto mediante valutazione dei valori di assorbanza a 280 nm e a 230 nm, estrapolandone dei rapporti quali indici di bontà dell'estratto. In particolare, lo strumento valuta l'assorbanza 260/280, ovvero quei valori di assorbimento della frazione di DNA su quella proteica. Tale indice, ad un valore ottimale, oscilla tra 1.8 e 2.0 e fornisce una stima di purezza dell'acido nucleico in funzione di eventuali inquinanti di natura proteica. Lo strumento è in grado inoltre di fornire una stima della contaminazione in sali e composti aromatici derivanti dalle fasi di lavorazione del campione, attraverso la misurazione del rapporto di assorbanza 260/230. Tale rapporto dovrebbe oscillare tra i valori di 2.0 e 2.2, e comunque inferiori a 3 per una ottima purezza dell'estratto, sebbene valori minori sono comunque ritenuti sufficienti per l'esecuzione delle successive prove. Il software di elaborazione dello strumento, a seguito del calcolo di tali parametri, fornisce inoltre una curva di bontà del DNA. Uno dei maggiori svantaggi nell'applicazione della spettrofotometria mediante impiego di UV, è data dalla incertezza di misurazione, in quanto il segnale registrato risente del contributo di DNA a singolo filamento e di altri contaminanti. Pertanto, per una stima più precisa della quantità di estratto e anche a fini comparativi, un saggio più accurato è stato impiegato mediante l'utilizzo dell'intercalante fluorescente PicoGreen. Il test è in grado infatti di minimizzare il contributo di ssDNA e RNA anche in presenza di contaminanti, fornendo quindi una misurazione più precisa del sistema Nanodrop. Tale saggio è stato realizzato mediante l'impiego del kit commerciale QuantiFluor dsDNA System (Promega) e si avvale della preparazione di una curva di standard di DNA a concentrazione nota per la quantificazione del campione incognito. Gli standard vengono preparati secondo le istruzioni fornite dalla casa produttrice e in particolare aggiungendo 500 µL di una soluzione stock di DNA lambda (100 µg/ml) ad un volume di 49,5 ml di una soluzione TE 1X (1:100), in modo da ottenere una soluzione di lavoro avente

concentrazione di 1 ng/uL in un volume finale di 50 ml. Gli standard a differente concentrazione sono quindi stati preparati come illustrato in tabella 8 in un volume finale di 25 µL.

Concentratione dello Standard (ng/µL)	Volume di Soluzione di Lavoro da prelevare (µL)	Volume di TE 1X da aggiungere (µL)
0	0	25
0.001	0.025	24.975
0.01	0.25	24.75
0.05	1.25	23.75
0.1	2.5	22.5
0.25	6.25	18.75
0.5	12.5	12.5
1	25	0

Tabella 8. Schema di preparazione per ottenere la curva di standard necessaria al calcolo della concentrazione di DNA nel campione. La colonna a sinistra rappresenta la concentrazione di standard da ottenere per la costruzione della curva. La concentrazione della soluzione di lavoro dello standard equivale a 1ng/µL.

Il sistema è molto sensibile, per cui la concentrazione di campione da saggiare deve essere inclusa nel range 1-25 ng/µL ed è per tale motivo che tutti i campioni estratti sono stati diluiti di un fattore 5, specificatamente 2 µL di estratto in 8 µL di acqua per PCR (DNase – RNase free). A questo punto è stata preparata la miscela di reazione diluendo specificatamente 25 µL di Picogreen in 4,975 ml di TE 1X (1:200), in un volume finale di 5 ml. È stata quindi preparata la piastra degli standard e quella dei campioni secondo la Tabella 9 portando ciascun pozzetto della piastra ad un volume finale di 100 µL. Un controllo di DNA a titolo noto (40 ng/µL) è stato inoltre aggiunto alla piastra degli standard come controllo di reazione.

	TE 1X	DNA	Picogreen Mix	Modalità di Caricamento
Campione	48 µL	2 µL	50 µL	
Standard		50 µL	50 µL	In doppio/2 colonne
Controllo	48 µL	2 µL	50 µL	In doppio/2 pozzetti

Tabella 9. Schema di preparazione della mix di reazione per la piastra standard e per quella dei campioni. Ciascun campione e standard sono stati portati a volume finale di 100 µL.

La lettura è stata effettuata in un lettore di fluorescenza per piastre, FLUOstar Optima (BMG Labtech) e i dati analizzati con il relativo software associato allo strumento. I dati restituiti dallo strumento sono rappresentati da valori di assorbanza (specifica della molecola intercalante) sia per la piastra degli standard che per quella dei campioni. Tali valori sono stati esportati su un foglio excel appositamente preparato per il calcolo della concentrazione di DNA nei campioni attraverso la costruzione di una retta degli standard interpolando la concentrazione degli standard sul valore di fluorescenza registrata.

5.4 Amplificazione e Sequenziamento del DNA

L'estrazione del materiale genetico rappresenta un punto critico per la buona riuscita di un saggio, in quanto il DNA target potrebbe risentire della presenza di inibitori di reazione contenuti naturalmente in certi alimenti e/o di quegli inquinanti frutto delle operazioni di purificazione, specificatamente relati alla presenza di residui organici o proteici. A tale scopo si è valutata la qualità dell'acido nucleico estratto mediante prova di amplificabilità e sequenziamento genomico di verifica, specificatamente per quei DNA estratti dalle matrici di riferimento bovina, ovina, suina ed equina e per i campioni ematici e muscolari prelevati durante le attività di controllo di tracciabilità genetica bovina. Data la loro composizione, tale metodica non si è applicata alle misture create e ai prodotti commerciali, in quanto la presenza, in taluni campioni, di ulteriori target di DNA, renderebbe non analizzabile il dato. Nello specifico, una porzione del gene mitocondriale Citocromo b di 474 bp è stato amplificato e sequenziato mediante utilizzo della seguente coppia di primer (80):

Nome	Sequenza Nucleotidica	Posizione*
Cyt B1	5'-CCAATGATATGAAAAACCATCGTT-3'	14700-14723
Cyt B2	5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC-3'	15174-15150

*I valori numerici sono riferiti alla posizione di tali sequenze nel mtDNA umano (Anderson *et al.*, 1981). Le sequenze di Cyt B1 e Cyt B2 sono localizzate rispettivamente nel filamento leggero (L, Light) e pesante (H, Heavy) del mtDNA.

I primer liofilizzati sono stati ricostituiti mediante aggiunta di acqua e portati ad una concentrazione stock di 200 µM. Un'aliquota è stata ulteriormente diluita in acqua ad una concentrazione finale di 20 pmol/µL (1:10), costituendo cosi la soluzione di lavoro. I campioni ematici di DNA (ad eccezione di quelli già disponibili in laboratorio) e delle specie pure sono stati quindi amplificati in doppio mediante impiego del kit AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems) utilizzando il seguente schema:

Componenti Mix (Concentrazione Iniziale)	**Concentrazione Finale**	**Volume per 1 campione**
Buffer (10X)	1X	5 µL
dNTPs (10 mM)	0.4 mM	2 µL
$MgCl_2$ (25 mM)	2 mM	4 µL
Cyt B1 (20 pmol/µL)	0.6 pmol/µL	1.5 µL
Cyt B2 (20 pmol/µL)	0.6 pmol/µL	1.5 µL
Taq Polimerasi	0.03 U/µL	0.3 µL
DNA (50 ng/µL)	1 ng/µL	1 µL
Acqua	Fino a 50 µL	35 µL

Le quantità indicate sono state calcolate per un singolo test in un volume finale di 50 µL di reazione e vanno moltiplicate per il numero complessivo di reazioni previste, considerando una reazione in più ogni 10. Allo stesso modo sono stati inseriti per la reazione dei controlli positivi e negativi, preparati esattamente come la reazione di cui sopra ma inserendo 1 µL di un controllo certamente positivo per ciascuna specie e 1 µL di acqua per i controlli negativi. I campioni cosi preparati sono stati amplificati secondo il protocollo descritto di seguito su un termociclatore GeneAmp 9700 (Applied Biosystems).

Parametri	Fasi di PCR Gene-Specifica					
		35 Cicli				
	Incubazione	Denaturazione	Annealing	Estensione	Estensione Finale	Hold
Temperatura	95°C	95°C	53°C	72°C	72°C	4°C
Tempo	10 minuti	50 secondi	50 secondi	1 minuto	7 minuti	∞

Al termine della PCR gli amplificati sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% oppurtunamente preparato mediante riscaldamento in un fornetto a

microonde di 2g di Agarosio in 100 ml di Tampone TE 0.5X. Quando l'agar si è completamente sciolto, sono stati aggiunti, per ogni 100 ml di gel di agarosio, 4 µL di GelRed Nucleic Acid Gel Stain (10,000X) (Biotium) quale intercalante del DNA. L'agarosio cosi preparato è stato colato su dei lettini di elettroforesi opportunamente selezionati per consentire la formazione di un numero variabile da 15 a 20 pozzetti sul gel una volta che esso si è solidificato. Per quanto concerne il caricamento del DNA su ogni pozzetto, specificatamente per ciascun campione e per i controlli positivo e negativo, 5 µL di amplificato sono stati prelevati e miscelati in un apposita piastra con 2 µL di Loading Buffer. Dopo miscelazione, 5 µL di tale soluzione sono stati caricati nei relativi pozzetti del gel di agarosio. Un pozzetto viene lasciato libero per permettere il caricamento di 2 µL di un marcatore di pesi molecolari, precisamente un Ladder 100 bp (1 µg/µL) (Invitrogen). La visualizzazione di una banda è stata effettuata mediante analisi ad un transilluminatore a UV e, in particolare, un segmento nell'intorno delle 500 bp è stato osservato per ciascun campione testato. A questo punto ciascun amplificato è stato purificato per la rimozione di primer e nucleotidi che potrebbero interferire con la successiva reazione di sequenziamento. In particolare, i campioni sono stati purificati mediante impiego del kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), seguendo le istruzioni della casa produttrice descritte di seguito.

1. Assemblare la colonna GFX MicroSpin sul Collection Tube appositamente contrassegnato.
2. Aggiungere 250 µL di Tampone di Cattura di Tipo 2 all'intero prodotto di PCR residuo.
3. Aggiungere a tale miscela 200 µL di Etanolo Assoluto
4. Centrifugare a 12000xg per 30 secondi a temperatura ambiente.
5. Eliminare il collection tube con l'eluato e trasferire la colonna GFX MicroSpin in nuovo collection tube contrassegnato.
6. Aggiungere 500 µL di Tampone di Lavaggio di Tipo 1
7. Centrifugare a 12000xg per 30 secondi a temperatura ambiente.
8. Eliminare il collection tube con l'eluato e trasferire la colonna GFX MicroSpin in nuovo tubo da microcentrifuga da 2 ml.
9. Aggiungere 10-50 µL di Tampone di Eluizione in funzione della intensità della banda visualizzata.
10. Incubare 60 secondi a temperatura ambiente.

11. Centrifugare a 12000xg per 30 secondi a temperatura ambiente.
12. Eliminare la colonna GFX MicroSpin e conservare a -20°C il tubo da microcentrifuga con l'eluato di DNA cosi purificato.

A questa fase segue una ulteriore elettroforesi di verifica su gel di agarosio al 2% dei prodotti purificati seguendo le medesime indicazioni sopra descritte. Tale fase si rende utile per la stima della intensità della banda di DNA (per confronto con il marcatore di pesi molecolari) e per valutare l'avvenuta purificazione del prodotto di PCR mediante scomparsa di una banda visualizzabile al fondo del gel durante la prima elettroforesi (residui di primer). I campioni cosi purificati vengono quantificati al Nanodrop 1000 (Thermo) e preparati per la PCR di Sequenza vera e propria utilizzando il kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Il kit si compone di tutti i reagenti necessari alla reazione, ad eccezione del primer e del DNA purificato, e sfrutta l'utilizzo dei cosiddetti dideossi nucleotidi (ddNTPs), ovvero terminatori di catena fluorescenti che bloccano di fatto la prosecuzione della reazione. Tale PCR, a differenza della precedente, impiega un solo primer per reazione, in quanto si tratta di un'amplificazione a cinetica lineare, resa possibile dall'impiego di una miscela di ddNTPs marcati e dNTPs. Alla fine della reazione il target di DNA così esteso, risulterà statisticamente presente nella miscela come frammenti che differiscono per la posizione di un nucleotide, rappresentato dal ddNTP marcato. La miscela di reazione utilizzata per la reazione di ciclosequenziamento è illustrata di seguito.

Componenti Mix (Concentrazione Iniziale)	Concentrazione Finale	Volume per 1 campione
BigDye RRM 3.1 (Ready Reaction Mix) (2.5X)	1X	8 µL
Big Dye Sequencing Buffer (5X)		4 µL
Cyt B1 (20 pmol/µL)	0.2 pmol/µL	0.2 µL
DNA (120-170 ng/µL)	3-10 ng/µL *	
Acqua	Fino a 20 µL	

* In funzione della dimensione della banda ottenuta (474 bp) (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Quick Reference)

Le quantità indicate sono state calcolate per un singolo test in un volume finale di 20 µL di reazione e vanno moltiplicate per il numero complessivo di reazioni previste, considerando una reazione in più ogni 10. Allo stesso modo è stato inserito per la reazione un controllo positivo fornito dal kit, preparato nel seguente modo:

Componenti Mix (Concentrazione Iniziale)	**Concentrazione Finale**	**Volume per 1 campione**
BigDye RRM 3.1 (Ready Reaction Mix) (2,5X)	1X	8 µL
Big Dye Sequencing Buffer (5X)		4 µL
Primer 21M13 Forward (2 pmol/µL)	0.3 pmol/µL	3 µL
DNA pGEM 3Zf+ (10 ng/µL)	1.5 ng/µL	3 µL
Acqua	Fino a 20 µL	2 µL

L'amplificazione è stata condotta sul termociclatore GeneAmp 9700 impiegando il seguente programma.

Parametri	Fasi di PCR di Sequenza				
		25 Cicli			
	Incubazione	Denaturazione	Annealing	Estensione	Hold
Temperatura	96°C	96°C	50°C	60°C	4°C
Tempo	1 minuto	10 secondi	5 secondi	4 minuti	∞

Al termine della reazione segue un nuovo step di purificazione degli amplificati al fine di rimuovere l'eccesso di primer ma soprattutto la quota di ddNTPs marcati che altrimenti interferirebbe durante la fase di elettroforesi capillare. Per questa fase è stato utilizzato il kit Illustra AutoSeq G-50 Dye (GE Healthcare), impiegando il seguente protocollo.

1. Dal kit è stata prelevata una nuova colonna e vortexata al fine di risospendere la resina contenuta all'interno.
2. La parte inferiore della colonna è stata staccata e il tappo svitato di ¼ .
3. La colonna è stata cosi posizionata all'interno di un tubo di raccolta in dotazione nel kit.
4. La colonna cosi preparata è stata centrifugata a 2000xg per 1 minuto a temperatura ambiente.
5. Al termine, il tubo da raccolta è stato eliminato e la colonna posizionata in un tubo da microcentrifuga da 2 ml.

6. A questo punto, tutto il volume della reazione di PCR di sequenza è stato caricato all'interno della colonna.
7. Questa è stata centrifugata a 2000xg per 1 minuto a temperatura ambiente.
8. L'eluato con il prodotto di PCR di sequenza purificato è stato trasferito a -20°C.

A questo punto il prodotto di PCR di sequenza è stato preparato per l'analisi al sequenziatore automatico. Specificatamente, per ciascun campione, sono stati aliquotati in ciascun pozzetto di una piastra da 96, 11 µL di formamide e 2 µL di amplificato purificato. La piastra cosi preparata, è stata denaturata a 95°C per 3 minuti e, al termine, posta immediatamente in ghiaccio per 2 minuti. Dopo di cio, è stata caricata nell'analizzatore genetico ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) per operare la lettura nucleotidica su 4 differenti pozzetti simultaneamente, in quanto lo strumento è dotato di 4 capillari indipendenti. In tale procedura, la sequenza target di DNA viene iniettata in un sottile tubo capillare e, i singoli nucleotidi che la compongono, colpiti da un raggio laser che eccita le molecole fluorescenti con cui essi sono stati marcati. Ciascuno dei fluorocromi, colpiti dal laser, viene eccitato e, come conseguenza di ciò, emetterà luce ad una particolare lunghezza d'onda. Il software, denominato Data Collection (Applied Biosystems), converte il pattern di emissioni fluorescenti in una serie di picchi colorati (elettroferogramma), corrispondenti ognuno ad un preciso nucleotide esattamente nel medesimo ordine in cui essi si trovano nella sequenza amplificata, ovvero nel frammento di DNA originale.

5.5 Real Time PCR

Al fine di saggiare l'applicabilità della metodica di Real Time PCR sulle misture alimentari e validarne il metodo, si è reso necessario l'implementazione del sistema di amplificazione dapprima sulle specie pure. I campioni di DNA per tali matrici, estratti secondo quanto detto precedentemente, sono stati amplificati utilizzando una coppia di primer e una sonda di tipo TaqMan specifici per una porzione del Cyt B del mtDNA oltre che per la specie di appartenenza. Da principio dunque, il saggio è stato mirato esclusivamente alla valutazione qualitativa del target testando le seguenti coppie di primer e sonde (81) per valutarne l'applicabilità al nostro metodo:

Specie	Sequenza dei Primer	
BOVINO	5'-CCCGATTCTTCGCTTTCCAT-3'	Forward
	5'-CTACGTCTGAGGAAATTCCTGTTG-3'	Reverse
	5'-(FAM)-CATCATAGCAATTGCC-(BHQ)-3'	TaqMan Probe B
OVINO*	5'-CCTTATTACACCATTAAAGACATCCTAGGT-3'	Forward
	5'-GGGTCTCCGAGTAAGTCAGGC-3'	Reverse
	5'-(HEX)-ACTAATCCTCATCCTCATGC-(BHQ)-3'	TaqMan Probe O
SUINO	5'-CTTGCAAATCCTAACAGGCCTG-3'	Forward
	5'-CGTTTGCATGTAGATAGCGAATAAC-3'	Reverse
	5'-(HEX)-ACAGCTTTCTCATCAGTTAC-(BHQ)-3'	TaqMan Probe S
EQUINO	5'-CAGCCAATGCGTATTCTGACTCT-3'	Forward
	5'-GTGTTCCACTGGCTGTCCG-3'	Reverse
	5'-(HEX)-AGTGGCAGACTTACTG-(BHQ)-3'	TaqMan Probe E

* Il probe per tale specie è stato utilizzato per le differenti reazioni sia con fluoroforo HEX che FAM.

A tale proposito un master mix *in house* è stata sviluppata in laboratorio e utilizzata per l'amplificazione delle specie in oggetto, ciascuna in triplicato. È stata quindi allestita la reazione di PCR utilizzando la seguente miscela di reagenti.

Componenti Mix (Concentrazione Iniziale)	Concentrazione Finale	Volume per 1 campione
Buffer (10X)	1X	2 µL
dNTPs (10 mM)	0.5 mM	1 µL
$MgCl_2$ (25 mM)	2 mM	2 µL
Primer 1 (20 pmol/µL)	0.6 pmol/µL	0.6 µL
Primer 2 (20 pmol/µL)	0.6 pmol/µL	0.6 µL
Probe di specie (10 pmol/µL)	0.3 pmol/µL	0.6 µL
Taq Gold Polimerasi	0.03 U/µL	0.3 µL
DNA (100 ng/µL)	10 ng/µL	2 µL
Acqua	Fino a 20 µL	11.2 µL

Le quantità indicate sono state calcolate per un singolo test e per una singola specie in un volume finale di reazione di 20 µL e vanno moltiplicate per il numero complessivo di reazioni previste, considerando una reazione in più ogni 10. Allo stesso modo sono stati inseriti nella reazione dei controlli negativi preparati esattamente come la reazione di cui sopra ma inserendo 2 µL di acqua. Ulteriormente, ciascuna coppia di primer è stata testata anche per la verifica di eventuali fenomeni di cross-ibridazione delle sonde specifiche specificatamente per la specie pollo (*Gallus gallus*), utilizzando le medesime condizioni sopra descritte e sostituendo solo la matrice di DNA da testare. L'amplificazione è stata quindi condotta impiegando il seguente programma di temperatura.

Parametri	Fasi di PCR Real Time			
		40 Cicli		
	Incubazione	Denaturazione	Annealing - Estensione	Hold
Temperatura	96°C	96°C	60°C	4°C
Tempo	10 minuti	15 secondi	45 secondi	∞

Al termine della reazione, appurata l'amplificabilità dei DNA mediante l'utilizzo delle specifiche coppie di primer e sonde, ovvero della master mix progettata in laboratorio, si è passati all'amplificazione del DNA di ogni singola specie utilizzando diluizioni seriali in base 10 dello stesso. Questa operazione è stata effettuata al fine di individuare il limite di detection (LOD) del saggio associato alla coppia di primer e probe specie-specifica, nonché alla costruzione di una curva di standard da utilizzare per la quantificazione delle miscele create e identificare quindi un limite di quantificazione (LOQ). Sono stati quindi allestiti una serie di tubi, opportunamente identificati per specie e fattore di diluizione, e aggiunti a ciascuno di essi 90 µL di acqua per PCR (DNase-RNase free). Dopo avere preparato, a partire dagli estratti per ciascuna specie, una soluzione madre a 100 ng/µL, 10 µL di essa sono stati prelevati ed aggiunti al tubo contenente 90 µL di acqua (1:10). Da questo, senza mai cambiare puntale e omogenando accuratamente, è stata ripetuta l'operazione prelevando il medesimo volume e aggiungendolo al tubo successivo, e cosi sino al completamento della serie. Sono stati quindi ottenuti 6 standard di DNA per ciascuna specie pura alle concentrazioni di 100 ng/µL, 10 ng/µL, 1 ng/µL, 0.1 ng/µL,

0.01 ng/µL e 0.001 ng/µL, ovvero da 10^2 a 10^{-3}, equivalenti rispettivamente al 100%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01% e 0.001%. A questo punto è stata allestita la reazione di Real Time PCR per ciascuno standard appartenente a ciascuna specie, impiegando dapprima 2 repliche per ciascuno di esso e successivamente utilizzando 10 replicati ai fini del calcolo accurato dei parametri di validazione. La reazione è stata preparata allestendo la miscela di reazione e applicando programma di temperatura come illustrato di seguito.

Componenti Mix (Concentrazione Iniziale)	**Concentrazione Finale**	**Volume per 1 campione**
Buffer (10X)	1X	2 µL
dNTPs (10 mM)	0.5 mM	1 µL
$MgCl_2$ (25 mM)	2 mM	2 µL
Primer 1 (20 pmol/µL)	0.6 pmol/µL	0.6 µL
Primer 2 (20 pmol/µL)	0.6 pmol/µL	0.6 µL
Probe di specie (10 pmol/µL)	0.3 pmol/µL	0.6 µL
Taq Gold Polimerasi	0.03 U/µL	0.3 µL
DNA (10^2 - 10^{-3} ng/µL)	10-10^{-4} ng/µL	2 µL
Acqua	Fino a 20 µL	11.2 µL

Parametri	Fasi di PCR Real Time			
		40 Cicli		
	Incubazione	Denaturazione	Annealing - Estensione	Hold
Temperatura	96°C	96°C	60°C	4°C
Tempo	10 minuti	15 secondi	45 secondi	∞

A questo punto, verificata l'applicabilità del metodo e costruito le rette di standard, si è proceduti con l'allestimento delle reazioni di Real Time PCR sia sui campioni di DNA estratti direttamente dalle misture carnee create, sia dai pool di DNA miscelati a differente percentuale a partire dai singoli estratti delle specie pure. Tale reazione è stata realizzata per quantificare il DNA target all'interno della miscela mediante comprazione con le rispettive rette di standard e valutarne i Ct. Pertanto, la miscela di reazione impiegata è stata quella progettata in laboratorio ed è stata eseguita secondo tale schema:

Componenti Mix (Concentrazione Iniziale)	Concentrazione Finale	Volume per 1 campione
Buffer (10X)	1X	2 µL
dNTPs (10 mM)	0.5 mM	1 µL
MgCl2 (25mM)	2 mM	2 µL
Primer 1 (20 pmol/µL)	0.6 pmol/µL	0.6 µL
Primer 2 (20 pmol/µL)	0.6 pmol/µL	0.6 µL
Probe di specie (10 pmol/µL)	0.3 pmol/µL	0.6 µL
Taq Gold Polimerasi	0.03 U/µL	0.3 µL
DNA Standard (10^2 - 10^{-3} ng/µL)	10-10^{-4} ng/µL	
DNA da misture (100 ng/µL) DNA da pool (100 ng/µL)	10 ng/µL	2 µL
Acqua	Fino a 20 µL	11.2 µL

Ciascun campione di standard, di DNA da miscela carnea e di pool di DNA è stato caricato in doppio su una piastra da 96 pozzetti, insieme alla mix di reazione. Non trattandosi di un sistema di tipo multiplex, ciascun target da identificare viene testato due volte, uno per ciascuna sonda di cui si suppone il campione sia costituito. Lo schema piastra seguito è quello riportato nelle tabelle 10a, 10b, 10c, 10d e il protocollo applicato è stato quello descritto per le precedenti reazioni di PCR.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	STD Bov 10	STD Bov 10	STD Bov 1	STD Bov 1	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-4}	STD Bov 10^{-4}
B	STD Eq 10	STD Eq 10	STD Eq 1	STD Eq 1	STD Eq 10^{-1}	STD Eq 10^{-1}	STD Eq 10^{-2}	STD Eq 10^{-2}	STD Eq 10^{-3}	STD Eq 10^{-3}	STD Eq 10^{-4}	STD Eq 10^{-4}
C	Mix Eq/Bov Probe E	Mix Eq/Bov Probe E	Mix Eq/Bov Probe B	Mix Eq/Bov Probe B	DNA Eq/Bov Probe E	DNA Eq/Bov Probe E	DNA Eq/Bov Probe B	DNA Eq/Bov Probe B	C-	C-	C-	C-
D												
E												
F												
G												
H												

Tabella 10a. Rappresentazione dello schema piastra impiegato per l'amplificazione degli standard di DNA, delle miscele carnee e dei pool di DNA miscelati. STD Bov e STD Eq si riferiscono agli standard di DNA rispettivamente bovino ed equino estratti direttamente dalle matrici pure certificate e diluiti in base 10.

Probe E: Sonda TaqMan specifica per la specie Equina (HEX); **Probe B**: Sonda TaqMan specifica per la specie Bovina (FAM).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD Bov 10	STD Bov 10	STD Bov 1	STD Bov 1	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-4}	STD Bov 10^{-4}
B	STD Su 10	STD Su 10	STD Su 1	STD Su 1	STD Su 10^{-1}	STD Su 10^{-1}	STD Su 10^{-2}	STD Su 10^{-2}	STD Su 10^{-3}	STD Su 10^{-3}	STD Su 10^{-4}	STD Su 10^{-4}
C	Mix Su/Bov Probe S	Mix Su/Bov Probe S	Mix Su/Bov Probe B	Mix Su/Bov Probe B	DNA Su/Bov Probe S	DNA Su/Bov Probe S	DNA Su/Bov Probe B	DNA Su/Bov Probe B	C-	C-	C-	C-
D												
E												
F												
G												
H												

Tabella 10b. Rappresentazione dello schema piastra impiegato per l'amplificazione degli standard di DNA, delle miscele carnee e dei pool di DNA miscelati. STD Bov e STD Su si riferiscono agli standard di DNA rispettivamente Bovino e Suino estratti direttamente dalle matrici pure certificate e diluiti in base 10.

Probe B: Sonda TaqMan specifica per la specie Bovina (FAM); **Probe S**: Sonda TaqMan specifica per la specie Suina (HEX).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD Bov 10	STD Bov 10	STD Bov 1	STD Bov 1	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-4}	STD Bov 10^{-4}
B	STD Ov 10	STD Ov 10	STD Ov 1	STD Ov 1	STD Ov 10^{-1}	STD Ov 10^{-1}	STD Ov 10^{-2}	STD Ov 10^{-2}	STD Ov 10^{-3}	STD Ov 10^{-3}	STD Ov 10^{-4}	STD Ov 10^{-4}
C	Mix Ov/Bov Probe O	Mix Ov/Bov Probe O	Mix Ov/Bov Probe B	Mix Ov/Bov Probe B	DNA Ov/Bov Probe O	DNA Ov/Bov Probe O	DNA Ov/Bov Probe B	DNA Ov/Bov Probe B	C-	C-	C-	C-
D												
E												
F												
G												
H												

Tabella 10c. Rappresentazione dello schema piastra impiegato per l'amplificazione degli standard di DNA, delle miscele carnee e dei pool di DNA miscelati. STD Bov e STD Ov si riferiscono agli standard di DNA rispettivamente Bovino e Ovino estratti direttamente dalle matrici pure certificate e diluiti in base 10.

Probe B: Sonda TaqMan specifica per la specie Bovina (FAM); **Probe O**: Sonda TaqMan specifica per la specie Ovina (HEX).

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	STD Ov 10	STD Ov 10	STD Ov 1	STD Ov 1	STD Ov 10^{-1}	STD Ov 10^{-1}	STD Ov 10^{-2}	STD Ov 10^{-2}	STD Ov 10^{-3}	STD Ov 10^{-3}	STD Ov 10^{-4}	STD Ov 10^{-4}
B	STD Su 10	STD Su 10	STD Su 1	STD Su 1	STD Su 10^{-1}	STD Su 10^{-1}	STD Su 10^{-2}	STD Su 10^{-2}	STD Su 10^{-3}	STD Su 10^{-3}	STD Su 10^{-4}	STD Su 10^{-4}
C	Mix Ov/Su Probe O	Mix Ov/Su Probe O	Mix Ov/Su Probe S	Mix Ov/Su Probe S	DNA Ov/Su Probe O	DNA Ov/Su Probe O	DNA Ov/Su Probe S	DNA Ov/Su Probe S	C-	C-	C-	C-
D												
E												
F												
G												
H												

Tabella 10d. Rappresentazione dello schema piastra impiegato per l'amplificazione degli standard di DNA, delle miscele carnee e dei pool di DNA miscelati. STD Ov e STD Su si riferiscono agli standard di DNA rispettivamente Ovino e Suino estratti direttamente dalle matrici pure certificate e diluiti in base 10;
Probe S: Sonda TaqMan specifica per la specie Suina (HEX); **Probe O**: Sonda TaqMan specifica per la specie Ovina (FAM).
NB. Genericamente Mix A/B si riferisce alla miscela di DNA ottenuta dalla mistura 1% carne A e 99% carne B (peso/peso); DNA A/B si riferisce alla miscela di DNA ottenuta mescolando 1% di DNA A e 99% di DNA B (volume/volume) a partire dai singoli DNA.

5.6 Implementazione del sistema Multiplex Real Time PCR

Uno degli obiettivi previsti da questo lavoro è stato la progettazione, il disegno e lo sviluppo di un saggio di Multiplex PCR Real Time specificatamente per le specie bovina (*Bos Taurus*), ovina (*Ovis aries*) e suina (*Sus scrofa*) mediante l'impiego di sonde molecolari di tipo TaqMan MGB (saggio *BOS*). Il primo passo allo sviluppo di un tale sistema è consistito nella scelta del target genetico da amplificare per ciascuna specie. Per fare ciò è stato effettuato uno studio di allineamento di sequenze nucleotidiche del mtDNA di tali specie, mirato alla ricerca di quelle regioni altamente variabili che potessero essere scelte come regioni target di ibridazione delle sonde. Al contempo la

ricerca ha previsto l'identificazione di quelle regioni di mtDNA sufficientemente costanti in modo da permettere il disegno di una unica coppia di primer per tutte le specie in esame. Si è partito dunque dalla ricerca sul database pubblico GeneBank delle sequenze di mtDNA per ogni specie (circa 16000 bp). Ogni sequenza è sata selezionata utilizzando il numero di accesso fornito dal database e importata nel software MEGA 6 per eseguire un allineamento multiplo e precisamente ha riguardato gli input KF926377.1 per *Bos taurus*, AF010406.1 per *Ovis aries* e AJ002189.1 per *Sus scrofa*. Esse sono state confrontate dapprima con differenti input di sequenza appartenenti alla medesima specie in modo da valutarne la variabilità interna e, successivamente, allineate con la sequenza nucleotidica delle altre specie (Figura 15). A partire da tali allineamenti è stata individuata una regione del mtDNA 12S utile al nostro lavoro, variabile e al contempo costante entro un certo range di lunghezza nucleotidica idonea alla sua amplificazione in Real Time PCR. Su tale regione di mtDNA sono stati dunque disegnati i probe per ciascuna specie e la coppia di primer (Tabella 11) tali da ottenere ampliconi di 115 bp, 115 bp e 117 bp rispettivamente per la specie bovino, ovino e suino. Ciascuna sequenza è stata confrontata con quelle depositate sul database BLAST per la verifica di eventuali cross ibridazioni con le sequenze di altre specie affini che potessero interferire con il saggio. Ulteriormente ciascun oligo è stato testato per la formazione di eventuali strutture secondarie quali hairpin, omodimeri ed eterodimeri per ciascuna coppia primer-primer, primers-sonde e sonde-sonde, utilizzando il tool online OligoAnalyzer 3.1 (IDT Technologies).

```
Bos     TTAGGCCATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAATAGATT-CAGTGCATC 1304
Ovis    TCAGGCCATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTAAATA-TGATATACT 943
Sus     TAAGGCCATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGCATGTAGTAATAAAAA 949
        * ****************************************  *  *     *  *

Bos     TAACCC-TATTTAAACGCACTAGCTACATGAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCAT 1363
Ovis    TAAACC-TATTTACATATATCAACCACACGAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCAT 1002
Sus     TAACCTATATTCAATTACAC-AACCATGCAAGAAGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCAT 1008
        *** *  **** *     *  * * *    *** *************************

Bos     ACTGGAAAGTGTGCTTGGATAAATCAAGATATAGCTTAAAC-AAAGCATCCAGTTTACAC 1422
Ovis    ACTGGAAAGTGTGCTTGGATAAACCAAGATATAGCTTAATT-AAAGCATCTAGTTTACAC 1061
Sus     ACTGGAAAGTGTGCTTGGATTA-CCAAAGCATAGCTTAAACTAAAGCACCTAGTTTACAC 1067
        ******************** *  ***   *********   ****** * *********
```

Figura 15. Rappresentazione grafica dell'allineamento di sequenza per le specie in esame. Sono evidenziate le sonde per ciascuna specie e la coppia di primer utilizzata. *Bos*: KF926377.1 *Bos taurus*; *Ovis* AF010406.1 *Ovis aries*; *Sus* AJ002189.1 per *Sus scrofa*.

Specie	Sequenza Primer/Sonde	
BOVINO	MCBt-(FAM)-ATTCAGTGCATCTAAC-(BHQ)(MGB)	TaqMan MGB Probe B
OVINO*	MCOa-(HEX)-CATATATCAACCACACGAGAG-(BHQ)(MGB)	TaqMan MGB Probe O
SUINO	MCSs-(HEX)-AATTACACAACCATGCAAG-(BHQ)(MGB)	TaqMan MGB Probe S
Primer BOS	MCF-5'-CATGAAGCACGCACACACC-3'	Forward
	MCR-5'-AGTATGCTTACCTTGTTACGACTTGTCT-3'	Reverse

Tabella 11. Schema delle sonde specie-specifiche e della coppia di primer impiegati per il saggio di Multiplex PCR. * Il probe per tale specie è stato utilizzato per le differenti reazioni sia con fluoroforo HEX che FAM.

Appurata la bontà teorica di primer e sonde e verificate la compatibilità delle temperature di melting data la natura multiplex del saggio, è stata allestita inizialmente una reazione di Real Time PCR a partire dagli estratti di DNA delle specie pure, mirata esclusivamente alla valutazione della formazione di eventuali prodotti secondari. Tale passaggio si rende necessario per valutare la funzionalità della coppia di primer all'interno del saggio e per avere dunque una stima dell'efficienza di reazione, ovvero per la valutazione di eventuali dimeri di primer e aspecifici. A tale scopo, la reazione è stata allestita utilizzando il kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen), il quale fornisce una master mix pronta all'uso al quale aggiungere la coppia di primer e il templato sul quale testare gli oligo. Specificatamente la reazione è stata allestita come illustrato di seguito e utilizzando il seguente ciclo di amplificazione per il sistema LighCycler 96 (Roche).

Componenti Mix (Concentrazione Iniziale)	Concentrazione Finale	Volume per 1 campione
2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	1X	10 µL
Primer 1 (20 pmol/µL)	0.5 pmol/µL	0.5 µL
Primer 2 (20 pmol/µL)	0.5 pmol/µL	0.5 µL
DNA (100 ng/µL)	10 ng/µL	2 µL
Acqua	Fino a 20 µL	7 µL

Parametri	Fasi di Real Time PCR			
		40 Cicli		
	Incubazione	Denaturazione	Annealing	Estensione
Temperatura	95°C	94°C	60°C	72°C
Tempo	15 minuti	15 secondi	30 secondi	30 secondi

Al termine della corsa il sistema opera l'analisi della curva di melting entro un intervallo di temperature settato manualmente prima dell'inzio della reazione e precisamente in un range di temperature compreso tra 65°C e 95°C. Ulteriormente, per evitare di incorrere in errori analitici attribuibili all'inefficacia degli oligo disegnati, le reazioni di multiplex sono state eseguite una serie di volte variando la concentrazione di reagenti della mix, di primer e sonde e, variando di poco le temperature di amplificazione. Nello specifico sono state testate concentrazioni finali di sonda variabile da 0.2 pmol/µL a 0.4 pmol/µL e di primer da 0.4 pmol/µL a 0.8 pmol/µL, considerando un rapporto di 2:1 primer sonda. Verificata l'amplificabilità di ogni specie per la specifica sonda, si è passati alla costruzione, anche in questo caso, della curva degli standard specifica per primer e probe impiegati a partire dalla specie pure, al fine di standardizzare la quantizzazione sugli stessi target e riducendo al minimo le variabili. Gli standard di DNA, come per la reazione precedente, sono stati preparati mediante diluizioni seriali in base 10 e, precisamente costituiti a partire dallo standard 10^2 ng/µL sino a quello di 10^{-3} ng/µL. La reazione è stata eseguita in un numero di 3 replicati per singolo valore di concentrazione e per tutte le specie, seguendo la medesima mix di reazione utilizzata per la valutazione qualitativa degli amplificati e ottimizzata nel seguente modo.

Componenti Mix (Concentrazione Iniziale)	**Concentrazione Finale**	**Volume per 1 campione**
Buffer (10X)	1X	2 µL
dNTPs (10 mM)	0.75 mM	1.5 µL
$MgCl_2$ (25 mM)	2 mM	2 µL
Primer 1 (20 pmol/µL)	0.5 pmol/µL	0.5 µL
Primer 2 (20 pmol/µL)	0.5 pmol/µL	0.5 µL
Probe B (10 pmol/µL) *Probe O* (10 pmol/µL) *Probe S* (10 pmol/µL)	0.25 pmol/µL	0.5 µL
Taq Gold Polimerasi	0.03 U/µL	0.3 µL
DNA (10^2 - 10^{-3} ng/µL)	10-10^{-4} ng/µL	2 µL
Acqua	Fino a 20 µL	11 µL

L'applicazione del protocollo di amplificazione utilizzato sinora si è dimostrato, congiuntamente alla mix di reazione impiegata, idoneo per il saggio duplex.

Parametri	Fasi di PCR Real Time			
		40 Cicli		
	Incubazione	Denaturazione	Annealing - Estensione	Hold
Temperatura	96°C	96°C	60°C	4°C
Tempo	10 minuti	15 secondi	45 secondi	∞

A questo punto, dopo avere allestito le curve di standard, si è proceduti con il saggio di multiplex PCR per le misture carnee e per i pool di DNA da essi creati. Anche in questo caso, l'impiego delle curve di taratura è finalizzato all'acquisizione di un dato quantitativo dei target di DNA nelle miscele, per interpolazione dei dati di Ct della specifica curva. La reazione ha previsto piccole variazioni della mix per compensare l'aggiunta di una sonda in più, utilizzando al contempo il medesimo ciclo di amplificazione:

Componenti Mix (Concentrazione Iniziale)	Concentrazione Finale	Volume per 1 campione
Buffer (10X)	1X	2 µL
dNTPs (10 mM)	0.75 mM	1.5 µL
$MgCl_2$ (25 mM)	2 mM	2 µL
Primer 1 (20 pmol/µL)	0.5 pmol/µL	0.5 µL
Primer 2 (20 pmol/µL)	0.5 pmol/µL	0.5 µL
Probe A (10 pmol/µL)	0.25 pmol/µL	0.5 µL
Probe B (10 pmol/µL)	0.25 pmol/µL	0.5 µL
Taq Gold Polimerasi	0.03 U/µL	0.3 µL
DNA da misture (100 ng/µL) DNA da pool (100 ng/µL)	10 ng/µL	2 µL
Acqua	Fino a 20 µL	10.5 µL

Parametri	Fasi di Multiplex PCR Real Time			
		40 Cicli		
	Incubazione	Denaturazione	Annealing - Estensione	Hold
Temperatura	96°C	96°C	60°C	4°C
Tempo	10 minuti	15 secondi	45 secondi	∞

Ciascun campione di standard, di DNA da miscela carnea e di pool di DNA è stato caricato in doppio su una piastra da 96 pozzetti. Per una conferma del dato, ciascun target da identificare è stato per l'appunto testato in doppio, ma con il vantaggio di saggiare due target nella medesima reazione. Pertanto, lo schema piastra seguito è quello riportato nelle tabelle 12a, 12b, 12c.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	STD Bov 10	STD Bov 10	STD Bov 1	STD Bov 1	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-4}	STD Bov 10^{-4}
B	STD Su 10	STD Su 10	STD Su 1	STD Su 1	STD Su 10^{-1}	STD Su 10^{-1}	STD Su 10^{-2}	STD Su 10^{-2}	STD Su 10^{-3}	STD Su 10^{-3}	STD Su 10^{-4}	STD Su 10^{-4}
C	Mix Su/Bov Probe S Probe B	Mix Su/Bov Probe S Probe B	DNA Su/Bov Probe S Probe B	DNA Su/Bov Probe S Probe B	C-	C-	C-	C-				
D												
E												
F												
G												

H												

Tabella 12a. Rappresentazione dello schema piastra impiegato per l'amplificazione degli standard di DNA, delle miscele carnee e dei pool di DNA miscelati secondo sistema Duplex PCR. STD Bov e STD Su si riferiscono agli standard di DNA rispettivamente Bovino e Suino estratti direttamente dalle matrici pure certificate e diluiti in base 10; **Probe S**: Sonda TaqMan specifica per la specie Suina (HEX); **Probe B**: Sonda TaqMan specifica per la specie Bovina (FAM).

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	STD Bov 10	STD Bov 10	STD Bov 1	STD Bov 1	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-1}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-2}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-3}	STD Bov 10^{-4}	STD Bov 10^{-4}
B	STD Ov 10	STD Ov 10	STD Ov 1	STD Ov 1	STD Ov 10^{-1}	STD Ov 10^{-1}	STD Ov 10^{-2}	STD Ov 10^{-2}	STD Ov 10^{-3}	STD Ov 10^{-3}	STD Ov 10^{-4}	STD Ov 10^{-4}
C	Mix Ov/Bov Probe O Probe B	Mix Ov/Bov Probe O Probe B	DNA Ov/Bov Probe O Probe B	DNA Ov/Bov Probe O Probe B	C-	C-	C-	C-				
D												
E												
F												
G												
H												

Tabella 12b. Rappresentazione dello schema piastra impiegato per l'amplificazione degli standard di DNA, delle miscele carnee e dei pool di DNA miscelati secondo sistema Duplex PCR. STD Bov e STD Ov si riferiscono agli standard di DNA rispettivamente Bovino e Ovino estratti direttamente dalle matrici pure certificate e diluiti in base 10; **Probe O**: Sonda TaqMan specifica per la specie Ovina (HEX); **Probe B**: Sonda TaqMan specifica per la specie Bovina (FAM);

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	STD Su 10	STD Su 10	STD Su 1	STD Su 1	STD Su 10^{-1}	STD Su 10^{-1}	STD Su 10^{-2}	STD Su 10^{-2}	STD Su 10^{-3}	STD Su 10^{-3}	STD Su 10^{-4}	STD Su 10^{-4}
B	STD Ov 10	STD Ov 10	STD Ov 1	STD Ov 1	STD Ov 10^{-1}	STD Ov 10^{-1}	STD Ov 10^{-2}	STD Ov 10^{-2}	STD Ov 10^{-3}	STD Ov 10^{-3}	STD Ov 10^{-4}	STD Ov 10^{-4}
C	Mix Ov/Su Probe O Probe S	Mix Ov/Su Probe O Probe S	DNA Ov/Su Probe O Probe S	DNA Ov/Su Probe O Probe S	C-	C-	C-	C-				
D												
E												
F												
G												

H												

Tabella 12c. Rappresentazione dello schema piastra impiegato per l'amplificazione degli standard di DNA, delle miscele carnee e dei pool di DNA miscelati secondo sistema Duplex PCR. STD Ov e STD Su si riferiscono agli standard di DNA rispettivamente Ovino e Suino estratti direttamente dalle matrici pure certificate e diluiti in base 10;
Probe O: Sonda TaqMan specifica per la specie Ovina (FAM); **Probe S**: Sonda TaqMan specifica per la specie Suina (HEX).
NB. Genericamente Mix A/B si riferisce alla miscela di DNA ottenuta dalla mistura 1% carne A e 99% carne B (peso/peso); DNA A/B si riferisce alla miscela di DNA ottenuta mescolando 1% di DNA A e 99% di DNA B (volum/volume) a partire dai singoli DNA.

Ulteriormente, le coppie di oligo progettate sono state testate anche per altre specie per la valutazione di eventuali fenomeni di cross reattività delle sonde specie-specifiche per altre specie affini, ovvero per escludere che le specifiche sonde non dessero segnali di amplificazione tra le specie target. Le reazioni sono state eseguite alle medesime condizioni delle precedenti e utilizzando una sola sonda per saggio (singleplex), specificatamente aggiungendo i) DNA target Equino, Pollo e Tacchino (*Meleagris gallopavo*) in sostituzione dei target specifici per le relative sonde e ii) DNA target Bovino, Ovino e Suino con le sonde non specifiche per tali specie (Tabella 12d). Come per le reazioni precedenti sono stati inseriti dei controlli negativi di reazione e dei controlli positivi rappresentati dal target di DNA specifico per la sonda.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	DNA Equino Probe B	DNA Equino Probe O	DNA Equino Probe S	DNA Pollo Probe B	DNA Pollo Probe O	DNA Pollo Probe S	DNA Tacchino Probe B	DNA Tacchino Probe O	DNA Tacchino Probe S			
B	DNA Ovino Probe B	DNA Suino Probe B	DNA Bovino Probe O	DNA Suino Probe O	DNA Bovino Probe S	DNA Ovino Probe S						
C	DNA Bovino Probe B	DNA Ovino Probe O	DNA Suino Probe S	C-	C-	C-						
D												
E												
F												
G												
H												

Tabella 12d. Rappresentazione dello schema piastra impiegato per la verifica delle cross reattività delle sonde per le specie Equina, Pollo e Tacchino e Bovino, Ovino e Suino.

5.7 Real Time PCR sui prodotti commerciali

Entrambe le metodiche di Real Time PCR applicate sinora sono state anche impiegate per l'identificazione di specie e la valutazione quantitativa nei campioni commerciali. Nello specifico, tali analisi sono essenzialmente di tipo secondarie alla metodica di screening eseguita mediante chip di DNA array. In accordo infatti con le procedure operative standard del laboratorio, solo in caso di positività allo screening per una delle specie non dichiarate, si procede, quando possibile, con la metodica semiquantitativa per la sua stima percentuale. Le reazioni di Real Time PCR sono state eseguite alle medesime condizioni di quanto fatto per le misture carnee e per i pool di DNA, rispettando quindi ciclo di amplificazione e concentrazioni dei reagenti. Ciascun campione evidenziato allo screening come positivo al target inquinante, è stato quindi testato, quando possibile, utilizzando le misture all'1% create e specifiche per la specie da ricercare insieme alle relative coppie primer/sonde, sia come saggio singleplex che duplex. Tale operazione si rende necessaria in quanto la conferma di positività al target contaminante è data dal confronto del suo valore di Ct nel campione presunto adulterato con il campione di riferimento preparato e contenente l'1% del target oggetto del test. Se infatti il valore del Ct del campione è uguale o inferiore al Ct del campione di riferimento, allora la frazione di massa è superata e il campione sarà considerato positivo.

5.8 Screening in Microarray

Unitamente all'applicazione dei saggi di Real Time PCR, tanto come singleplex che come multiplex, l'impiego di un metodo di screening sensibile e specifico per un certo numero di specie, risulta di fondamentale importanza in una procedura di identificazione genetica, in quanto la sostituzione di specie può interessare un ampio panorama animale che tuttavia può sfuggire alla rilevazione con il saggio di Real Time se non specificatamente progettato. L'impiego di un saggio di chip array per le matrici

alimentari di origine animale a base di carne, rappresenta quindi un test di screening alla rilevazione di specie complesse, non usuali, che richiede immediatamente a valle l'impiego di tecniche quantitative nel caso di positività del saggio ad una delle specie. Il metodo ha previsto l'impiego del kit LCD Array Kit Meat 4.5 (Chipron) il quale riesce ad identificare fino a 24 specie animali in un unico saggio di ibridazione (Figura 16).

Beef	*Bos taurus*	Red Deer	*Cervus elaphus*
Dog/Wolf	*Canis lupus*	Axis Deer	*Cervus axis / Axis axis*
Pork	*Sus scrofa*	Fallow Deer	*Dama dama*
Sheep	*Ovis aries*	Reindeer	*Rangifer tarandus*
Goat	*Capra hircus*	Springbok	*Antidorcas marsupialis*
Buffalo	*Bubalus bubalis*	Chicken	*Gallus gallus*
Horse	*Equus caballus*	Turkey	*Meleagris gallopavo*
Cat	*Felis cattus*	Goose	*Ansa albifrons*
Hare	*Lepus europaeus*	Mallard Duck	*Anas platyrhyncos*
Rabbit	*Oryctolagus cuniculus*	Muscovy Duck	*Cairina moschata*
Kangaroo	*M. giganteus / M. rufus*	Pheasant	*Phasianus cholchicus*
Roe Deer	*Capreolus capreolus*	Ostrich	*Struthio camelus*

Figura 16. Elenco delle 24 specie identificabili mediante impiego del kit LCD Array Kit Meat 4.5.

Brevemente, l'identificazione della specie genetica si basa sulla ibridazione di frammenti del gene mitocondriale rDNA 16S su specifici probe di cattura spottati su un supporto solido di microarray, suddiviso in 8 camere di ibridazione (8 campioni per reazione). La tecnica prevede l'amplificazione per PCR di una porzione di tale gene utilizzando una unica coppia di primer comune a tutte le specie e sfruttando dunque le differenze nucleotidiche degli ampliconi generati per ibridare con le specifiche sonde. Durante questa fase, i frammenti di PCR sono marcati con Biotina. Successivamente gli ampliconi sono ibridati con lo specifico probe e l'eccesso rimosso mediante lavaggi consecutivi. I frammenti saldamente legati alle specifiche sonde, sono visualizzati mediante incubazione con Streptavidina coniugata alla Perossidasi e susseguente formazione di un precipitato scuro dopo aggiunta di un substrato per la perossidasi stessa detto TMB (tetrametilbenzidina) (Figura 17).

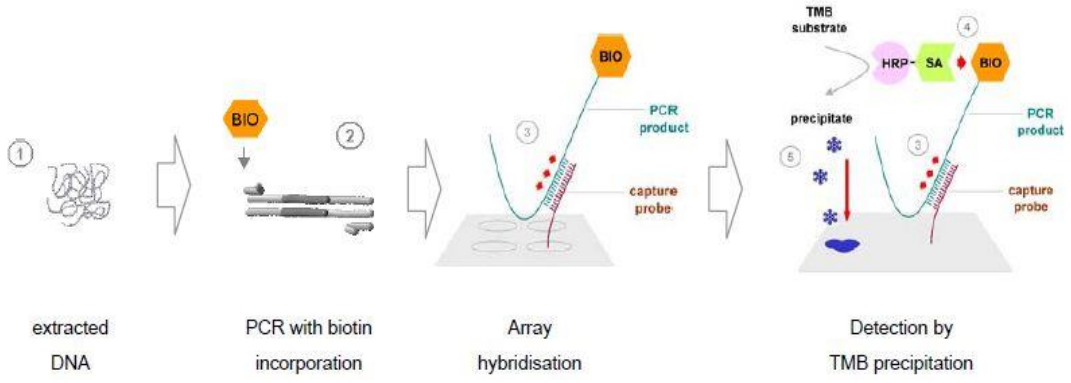


Figura 17. Rappresentazione grafica del principio del test di microarray.

Tale metodica, validata dalla casa produttrice, è stata comunque verificata all'interno del laboratorio impiegando miscele di DNA a eguale concentrazione finale a partire dalle specie pure di Bovino, Ovino, Suino, Equino, Pollo e Tacchino. Per il saggio sono stati impiegati due chip di array, ciascuno costituito da 8 zone di ibridazione, e la miscela fatta ibridare per ciascuna zona (escluso un controllo negativo), in modo da ottenere un dato accurato e riproducibile. Successivamente alla verifica del saggio, la metodica è stata quindi applicata ai prodotti commerciali come screening identificativo. Il primo step di esecuzione della metodica ha previsto l'allestimento della reazione di PCR utilizzando la mix di reazione e il protocollo di amplificazione di seguito riportati.

Componenti Mix Chipron	Volume per 1 campione
10X Buffer (incluso 15-20 mM MgCl2)	2.5 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Primer Mix MEAT	1.5 µL
Taq Gold Polimerasi (5U/µL)	0.3 µL
DNA (2-20 ng/µL)	5 µL
Acqua	14.7 µL
Volume finale	25 µL

Parametri	Fasi di PCR ID-Specie Chipron					
		35 Cicli				
	Incubazione	Denaturazione	Annealing	Estensione	Estensione Finale	Hold
Temperatura	95°C	94°C	57°C	72°C	72°C	4°C
Tempo	7 minuti	30 secondi	45 secondi	45 secondi	2 minuti	∞

Al termine della PCR gli amplificati sono stati sottoposti a una corsa elettroforetica su gel di agaorsio al 2%, preparato come descritto in precedenza. Le bande attese oscillano in un range di 115-125 bp in base al target amplificato, precisamente *Bos taurus* e *Sus scrofa* genereranno un amplificato rispettivamente di 116 bp e 119 bp, mentre *Equus caballus* genererà un frammento di 124 bp. Tale fase si è resa necessaria per l'ottimizzazione del saggio e per una maggiore certezza di amplificazione per ciascun campione in modo da evitare la presenza di falsi segnali di ibridazione. A questo punto, prima di iniziare la fase di ibridazione, è stato settato a 35°C un bagnetto termostatato e versata una goccia d'acqua in ogni angolo della camera umida che ospiterà la slide di array. È stata quindi preparata la Hybridisation Mix, miscelando, per ciascun campione, 22 µL di Buffer di Ibridazione B e 2 µL di Modulatore. A tale miscela è stato aggiunto 10 µL dei rispettivi prodotti di PCR biotinilati, per cui saranno allestiti un numero di tubi contenenti la miscela di ibridazione pari al numero di campioni di testare. A questo punto la slide è stata inserita nella camera umida e 28 µL della mix di ibridazione-prodotto di PCR sono stati aggiunti a ciascuna stazione di ibridazione (x8) facendo in modo che tale mix venga in contatto con l'intera zona di reazione del singolo pozzetto e in seguito incubati 30 minuti a 35°C. Nel frattempo, sono state preparate tre vaschette riempite con 150 ml di Wash Buffer 1X (Stock Solution 200X) per operare il lavaggio della slide per la rimozione dell'eccesso di amplicone non ibridato. La camera umida è stata quindi tirata fuori dal bagnetto termostatato, e la slide di array estratta e immersa completamente nella prima vaschetta, muovendola delicatamente da destra a sinistra per circa 3 volte. Al termine, la slide è stata trasferita nella seconda vaschetta per ripetere tale operazione e infine nella terza dove è stata lasciata immersa per 1 minuto. Questa fase è critica alla buona riuscita del saggio in quanto, una immersione troppo rapida porterebbe a un cross-contaminazione delle soluzioni di ibridazione contenenti i prodotti amplificati tra i diversi array. La slide è stata successivamente asciugata per 15 secondi in un CHIP spin e

preparata per la fase di marcatura. Una Labelling Mix è stata allestita miscelando, per ciascun campione, 27 µL di Buffer di diluizione, 3 µL di Modulatore e 0.2 µL di Marcatore. Dopo una rapida vortexata, 28 µL di tale miscela sono stati dispensati in ciascuno array della slide facendo in modo che venga in contatto con l'intera zona di reazione e in seguito incubati 5 minuti a temperatura ambiente. Sono stati ripetuti nuovamente i lavaggi con 150 ml di Wash Buffer 1X fresco, lasciando anche in questo caso, immersa la slide nell'ultima vaschetta per un minuto. Il chip è stato quindi asciugato per 15 secondi nel CHIP Spin. A questo punto 28 µL di Stain Solution vengono dispensati in ciascuno array e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Trascorso tale tempo, è stato necessario quindi bloccare la reazione immergendo per 15 secondi la slide nella terza vaschetta di lavaggio. È seguita dunque una nuova fase di asciugatura del chip di array. Le slide cosi preparate sono state analizzate mediante rilevazione del segnale d'ibridazione tramite Slide Scanner e lo Slide Reader software. Un riepilogo del workflow eseguito per l'allestimento del saggio è mostrato in figura 18.

Figura 18. Schemma illustrativo del workflow per il saggio di Microarray applicato alle matrici alimentari commerciali utilizzando il kit LCD Array Kit Meat 4.5 (Chipron).

5.9 Tipizzazione dei marcatori STR

Per il processo di amplificazione dei loci STR è stata utilizzata una PCR multiplex, sulla quale è stato compiuto uno studio end point atto a valutare la presenza dei frammenti di interesse, impiegando il kit StockMarks for Cattle Genotyping (Applied Biosystems). Questo kit fornisce un sistema di genotracciabilità basato sulla simultanea amplificazione di 11 marcatori STR di interesse mediante Multiplex PCR consentendo al contempo l'analisi mediante elettroforesi capillare. Le coppie di primers forward e reverse per ciascun locus da analizzare sono premiscelati in un'unica primer mix e uno dei due oligo è marcato con uno specifico fluoroforo del tipo FAM, JOE o NED. Primers specifici per loci diversi che cadono in ranges dimensionali sovrapposti sono comunque diversificabili grazie alle marcature con fluorocromi diversi. Nel caso dei bovini, tali marcatori STR sono del tipo dinucleotidici e raccomandati, per scopi identificativi, dall'ISAG (International Society of Animal Genetics) e riportati qui di seguito in figura 19.

LOCUS	*DYE*	*COLOR*	*SIZE*
TGLA227	FAM	Blu	64-115
BM2113	FAM	Blu	116-146
TGLA53	FAM	Blu	147-197
ETH10	FAM	Blu	198-234
SPS115	FAM	Blu	235-265
TGLA126	JOE	Verde	104-131
TGLA122	JOE	Verde	134-193
INRA23	JOE	Verde	193-235
ETH3	NED	Giallo	90-135
ETH225	NED	Giallo	135-165
BM1824	NED	Giallo	170-218

Figura 19. Marcatori STR impiegati per lo studio di tracciabilità genetica sui capi bovini in esame. Sono riportati i loci STR insieme alla molecola fluorescente con cui risultano marcati, il colore risultante dalla fluorescenza emessa e l'intervallo di lunghezza degli alleli per ciascun locus.

Precisamente, per ciascun campione analizzato, 1 µL di DNA alla concentrazione di 20 ng/µL, è stato aggiunto alla miscela di reazione di seguito riportata. Oltre ai campioni da esaminare, è stato preparato un controllo positivo di reazione impiegando un 1 µL di DNA bovino a titolo noto fornito dal kit (20 ng/µL) e un controllo negativo, costituito da 1 µL di acqua bidistillata sterile. Si è proceduto, quindi, al trasferimento delle provette al termociclatore ABI 9700 e all'impostazione del programma di amplificazione di seguito riportato.

Componenti Mix StockMarks	**Volume per 1 campione**
StockMarks PCR Buffer	3 µL
dNTPs Mix	4 µL
Primer MiX	5.5 µL
Taq Gold Polimerasi	0.5 µL
DNA (20 ng/µL)	1 µL
Acqua	1 µL
Volume finale	15 µL

Parametri	Fasi di Multiplex PCR						
		31 Cicli					
	Incubazione	Denaturazione	Annealing	Estensione	Estensione Finale	Step Finale	Hold
Temperatura	95°C	94°C	50% ramp 61°C	80% ramp 72°C	72°C	25°C	4°C
Tempo	10 minuti	45 secondi	45 secondi	1 minuto	1 ora	2 ore	∞

Dopo la fase di amplificazione, i prodotti di PCR sono stati diluiti in un rapporto di 1:10, nonchè 15 µL di amplificato sono stati aggiunti a 135 µL di acqua deionizzata. Si è passati quindi alla preparazione dei campioni preparando la miscela di reazione di seguito riportata:

Reagenti	Volume per 1 campione
Formamide	11.5 µL
GeneScan ROX 500 Size STD	0,5 µL
DNA Diluito	1 µL
Volume finale	13 µL

Di tale miscela, 12 µL sono stati trasferiti in una piastra da 96, in un numero di pozzetti pari al numero di campioni da analizzare, e aggiungendo per ognuno di essi 1 µL di amplificato diluito. I campioni così preparati sono denaturati a 95°C per 3 minuti in un termociclatore e, al termine, posti in ghiaccio per 2 minuti. La piastra è stata quindi trasferita nell'analizzatore genetico ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) per operare la corsa dei frammenti. Il polimero di corsa utilizzato è stato il GS STR POP 7 (1 ml) con un modulo di lavoro che impiega il filtro F per le fluorescenze d'interesse (FAM – JOE – NED – ROX). L'analisi dei dati è stata condotta mediante impiego del software GeneMapper v4.1 che analizza le corse dei frammenti marcati restituendo un dato sottoforma di elettroferogramma.

Uno schema riassuntivo delle metodiche applicate a ciascuna matrice è visualizzabile in figura 20.

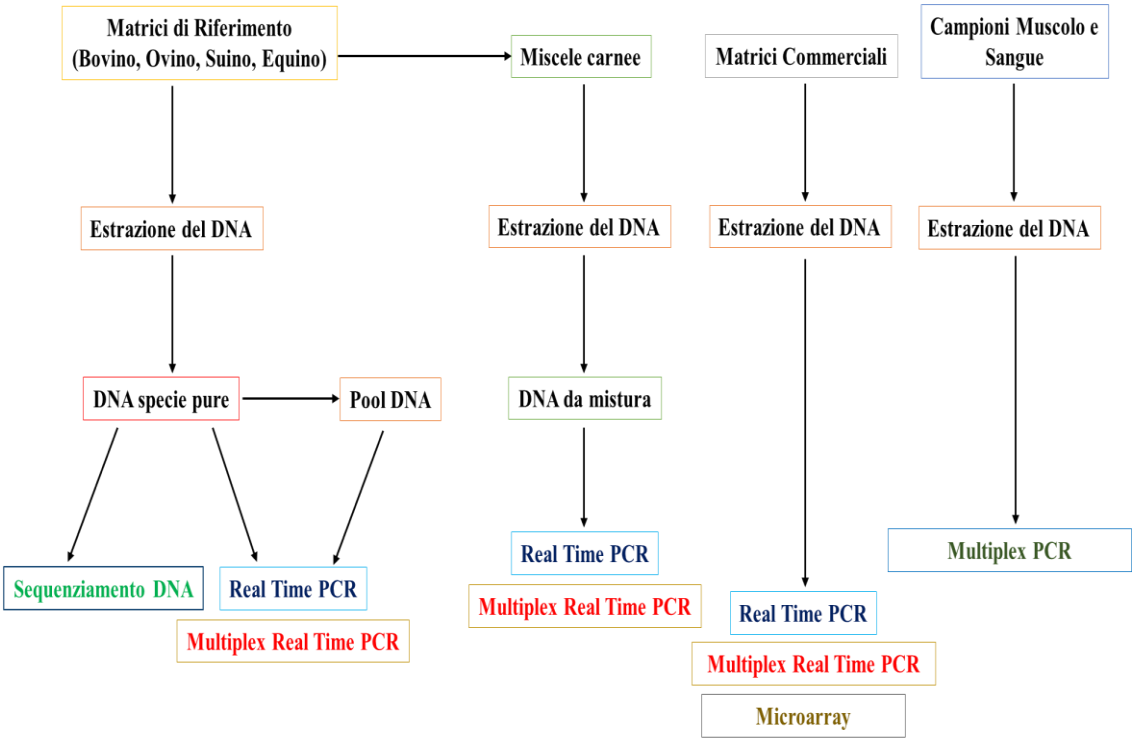


Figura 20. Rappresentazione schematica delle metodiche applicate alle matrici in esame.

6. RISULTATI

6. 1 Quantificazione degli estratti di DNA

I valori medi di concentrazione di DNA e della sua purezza, ottenuti mediante le misurazioni con Nanodrop e Picogreen, sono riportati in tabella 13. Per quanto riguarda il saggio in Picogreen, verificata la linearità della curva mediante i parametri intercetta, slope e r^2 (Figura 21), i dati di assorbanza sono stati trasferiti su un foglio Excel preimpostato il quale calcolerà automaticamente la concentrazione di DNA nel campione orginale, tenendo conto del fattore di diluizione applicato (1:5), della quantità di DNA aggiunta per il saggio (2 µL) e del volume in cui lo stesso DNA è incluso nel pozzetto (100 µL). Cosi facendo si è ottenuta la concentrazione di DNA per tutti i campioni estratti e, ulteriormente, un foglio di calcolo è stato impostato per normalizzare tali valori di DNA alla concentrazione desiderata mediante aggiunta di uno specifico volume di acqua.

	Range di Concentrazione DNA		**Rapporti di Assorbanza**		**Modalità di Estrazione**	
	Picogreen	*Nanodrop*	*260/280*	*260/230*	*Manuale*	*Automatizzata*
Specie pure e Misture	100.8 - 103.5	101.3 - 105.6	1.59-1.81	1.72-1.92	+	-
Prodotti commerciali	9.3 – 86.8	9.5 - 87.2	1.77-1.91	0.88-2.18	+	-
Campioni ematici	27.9-33.8	28.5-34.6	1.48-1.74	0.91-1.81	+	+
Muscolo	84.2 – 87.6	85.4-88.7	1.78-1.89	1.47-2.12	+	-

Tabella 13. La tabella mostra i range di valori di concentrazione di DNA (ng/µL) saggiati con i due metodi e raggruppati per categoria di matrice e modalità di estrazione. Sono inoltre evidenziati i range dei valori di assorbanza dei DNA in rapporto alla componente proteica (260/280) e organica (260/230) estrapolati esclusivamente dall'analisi sul dispositivo Nanodrop.

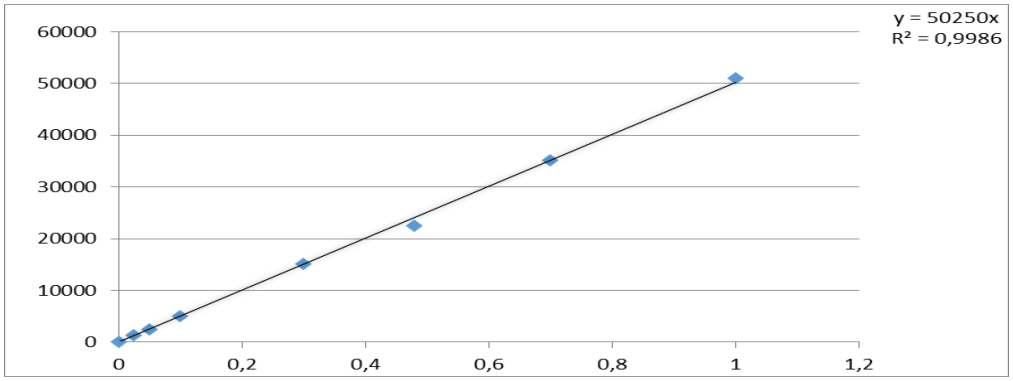


Figura 21. Rappresentazione grafica della retta degli standard ottenuta mediante saggio quantitativo con Picogreen. Sono mostrati i valori dell'intercetta y e di R^2 quali indici di bontà della curva.

6.2 Sequenziamento del DNA

L'amplificazione e il sequenziamento del DNA estratto a partire dalle matrici di riferimento bovina, ovina, suina ed equina e per i campioni ematici e muscolari ha dato esito positivo, verificando dunque l'identità di specie per tutte le matrici e, primariamante, l'amplificabilità del materiale genetico. I dati grezzi sono stati analizzati mediante il software Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystems) e gli elettroferogrammi ispezionati visivamente per la ricerca di eventuali attribuzioni di basi errate. Per tutte le specie analizzate, i frammenti di Cyt B correttamente sequenziati oscillavano in un range di circa 400 bp, sufficienti a ottenere un dato di allineamento e attribuzione in modo significativo. L'approccio identificativo ha previsto quindi l'interrogazione del database online BLAST mediante inserimento delle sequenza ritrovate. Come output, il tool ha fornito un dato di allineamento basato sull'omologia di sequenza condivisa con le specie di riferimento disponibili sul database stesso (Figura 22). Per tale prova, il dato è stato considerato significativo per valori di match superiori al 99% ($p<0.05$).

Ovis aries mitochondrion, complete genome

Sequence ID: KR868678.1 Length: 16617 Number of Matches: 1

Range 1: 14153 to 14548 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
732 bits(396)	0.0	396/396(100%)	0/396(0%)	Plus/Plus

```
Query  1      AACACTAATGATCAACATCCGAAAAACCCACCCACTAATAAAAATTGTAAACAACGCATT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14153  AACACTAATGATCAACATCCGAAAAACCCACCCACTAATAAAAATTGTAAACAACGCATT  14212

Query  61     CATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATTTCATCATGATGAAACTTTGGCTCTCTCCTAGG  120
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14213  CATTGATCTCCCAGCTCCATCAAATATTTCATCATGATGAAACTTTGGCTCTCTCCTAGG  14272

Query  121    CATTTGCTTAATTTTACAGATTCTAACAGGCCTATTCCTAGCAATACACTATACACCTGA  180
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14273  CATTTGCTTAATTTTACAGATTCTAACAGGCCTATTCCTAGCAATACACTATACACCTGA  14332

Query  181    CACAACAACAGCATTCTCCTCTGTAACCCACATTTGCCGAGACGTAAACTATGGCTGAAT  240
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14333  CACAACAACAGCATTCTCCTCTGTAACCCACATTTGCCGAGACGTAAACTATGGCTGAAT  14392

Query  241    TATCCGATATATACACGCAAACGGGGCATCAATATTTTTTATCTGCCTATTTATGCATGT  300
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14393  TATCCGATATATACACGCAAACGGGGCATCAATATTTTTTATCTGCCTATTTATGCATGT  14452

Query  301    AGGACGAGGCCTATACTATGGATCATATACCTTCCTAGAAACATGAAACATCGGAGTAAT  360
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14453  AGGACGAGGCCTATACTATGGATCATATACCTTCCTAGAAACATGAAACATCGGAGTAAT  14512

Query  361    CCTCCTATTTGCGACAATAGCCACAGCATTCATAGG  396
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  14513  CCTCCTATTTGCGACAATAGCCACAGCATTCATAGG  14548
```

Figura 22. Allineamento parziale della sequenza del citocromo b del mtDNA per la specie di riferimento Ovino. I dati sono stati ottenuti mediante il software BLAST. Query: sequenza fornita come input di dati. Sbjct: sequenza di confronto presente nel database informatico.

6.3 Analisi dei dati di Real Time PCR

La metodica di Real Time PCR descritta è stata utilizzata per l'identificazione genetica e la stima della presenza percentuale di una determinata specie in campioni costituiti da matrici alimentari complesse trattate e non a base di carne della specie bovino, ovino, suino ed equino. Il test è stato applicato dapprima esclusivamente agli estratti provenienti dalle specie pure al fine di determinare l'applicabilità del saggio in termini qualitativi. I risultati hanno mostrato curve di amplificazione per tutti i campioni testati in un range di Ct complessivo da 18.05 per la specie ovina a 21.67 per quella equina, utilizzando volumi di DNA, per ciascuna specie, ad una concentrazione finale in reazione di 10 ng/uL (Figura 23). L'immagine mostra le curve di amplificazione per ciascuno gruppo di specie (in triplicato) insieme alle curve fornite dai controlli negativi e quelle date dalle prove di cross-ibridazione per la matrice pollo. La piena sovrapponibilità dei Ct registrati per le curve delle diverse specie e all'interno dello stesso gruppo di replicati (Tabella 14), a

parità di concentrazione di templato, ci ha fornito un dato qualitativo relativamente alla specificità di ciascuna sonda per il corrispettivo target, dettata anche dall'assenza di curve aspecifiche di cross-ibridazione per la specie sopra citata.

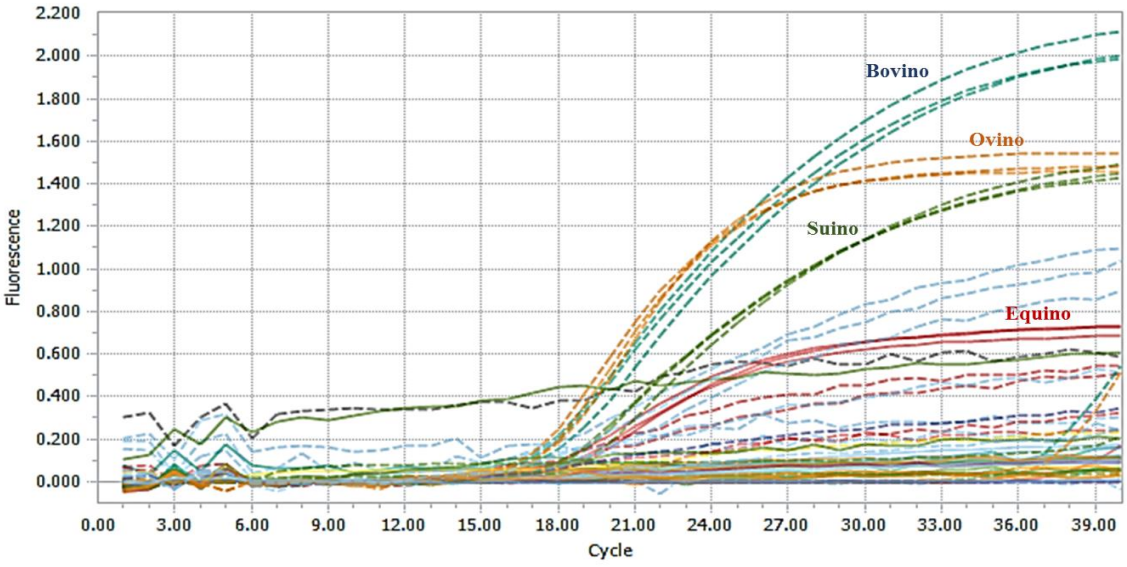


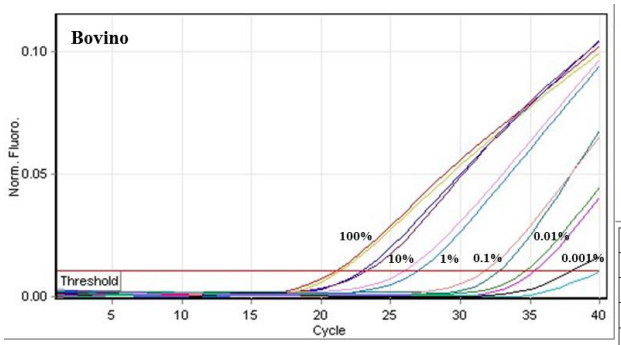
Figura 23. Rappresentazione grafica delle curve di Real Time ottenute per le matrici di riferimento Bovina, Ovina, Suina ed Equina (soglia di Threshold settata a 0.20). Sono riportate inoltre le curve di amplificazione negative ottenute per la specie Pollo, per i controlli negativi per ciascuna specie (n=3) e le curve di idrolisi delle sonde per la specie Bovina e Ovina.

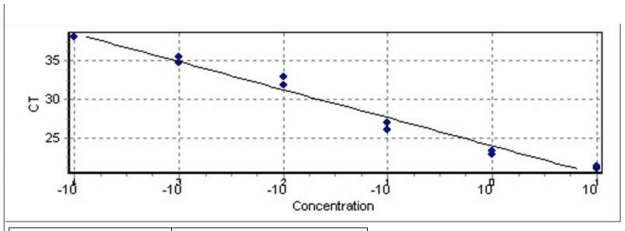
Specie	Ct	Esito
Bovino	18.85	+
	18.17	+
	18.55	+
Ovino	18.77	+
	18.05	+
	18.40	+
Suino	19.60	+
	19.99	+
	19.34	+
Equino	19.86	+
	20.73	+
	21.67	+

Specie	Ct	Esito
Pollo	na	-
	na	-
	na	-
Bovino	37.90	+
Ovino	38.38	+

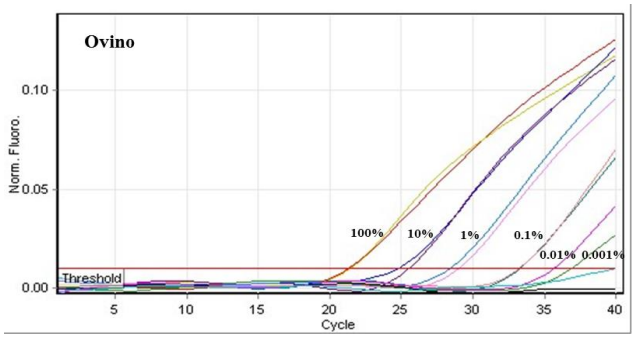
Tabella 14. Rappresentazione schematica dei Ct delle curve di amplificazione per le specie pure.

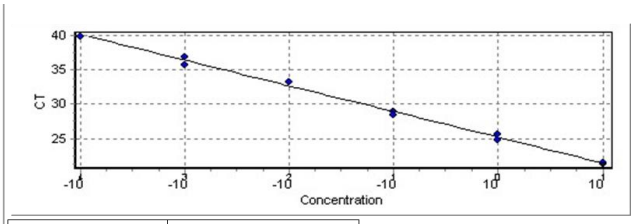
Dall'immagine si nota inoltre come all'approssimarsi del 38°/39° ciclo, si ha un innalzamento della curva di amplificazione per i controlli negativi bovini e ovini. La ragione di tale effetto risiede probabilmente in un effetto idrolitico della sonda, che all'esaurirsi dei cicli di amplificazione subisce una degradazione e conseguente emissione di luce. Relativamente all'intensità di fluorescenza emessa, per i replicati bovini, essa risulta la massima registrata tra tutti i campioni in esame. Una valore di fluorescenza intermedia e sovrapponibile è stata riscontrata per le specie ovina e suina, mentre l'emissione per la sonda equina ha fatto registrare la più bassa intensità di fluorescenza registrata (0.70). Successivamente, sono state analizzate le curve di amplificazione per ciascuna specie in rapporto alle diluizione seriali in base 10 realizzate e, precisamente, costruite su sei punti di concentrazione, da 100 ng/µL a 0.001 ng/µL, rispettivamente indicanti il 100% e lo 0.001% di target. Le curve e le rette di taratura per ciascuna specie, eseguite inizialmente in doppio per una prima valutazione, sono riportate in figura 24 insieme ai parametri di corsa.



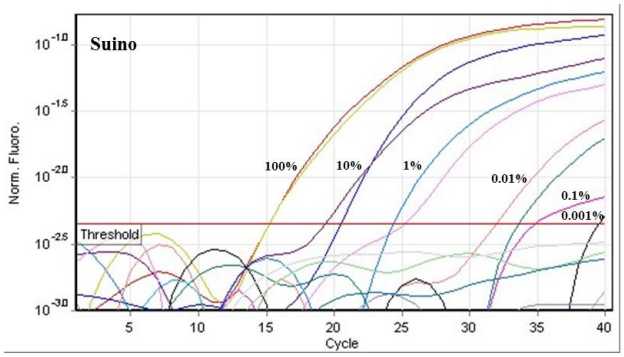


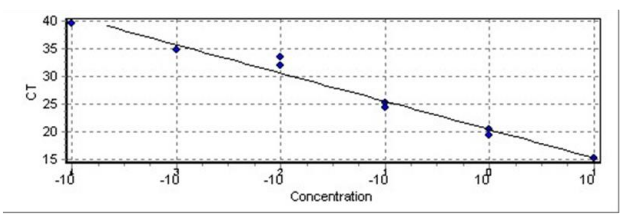
Reaction efficiency (*)	0.92619 (* = 10^(-1/m) - 1)
Slope	-3.51198
Y	23.94923
R Value	0.98748
R^2 Value	0.97511



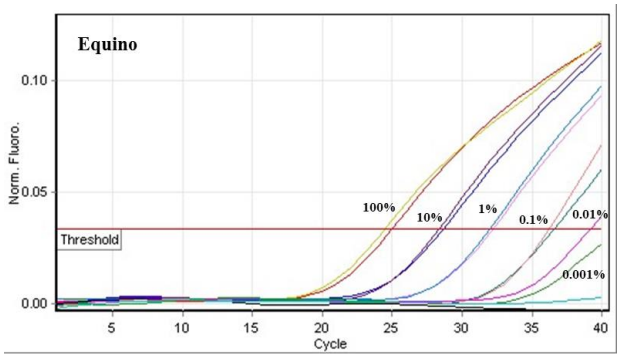


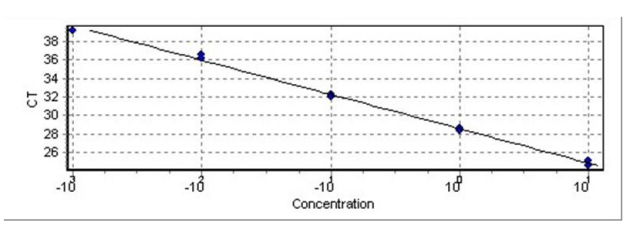
Reaction efficiency (*)	0.91690 (* = 10^(-1/m) - 1)
Slope	-3.53815
Y	25.18214
R Value	0.99732
R^2 Value	0.99465





Reaction efficiency (*)	0.89452 (* = 10^(-1/m) - 1)
Slope	-3.60313
Y	20.34332
R Value	0.98843
R^2 Value	0.977





Reaction efficiency (*)	0.92885 (* = 10^(-1/m) - 1)
Slope	-3.50415
Y	28.53271
R Value	0.99787
R^2 Value	0.99575

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc	Calc Conc ng/µL
1		STD 1 BOVINO	Standard	21.03	10 ng/µL	1.215E+1
2		STD 1 BOVINO	Standard	21.40	10 ng/µL	1.165E+1
3		STD 2 BOVINO	Standard	22.90	1 ng/µL	9.679E-1
4		STD 2 BOVINO	Standard	23.27	1 ng/µL	8.816E-1
5		STD 3 BOVINO	Standard	25.99	0.1 ng/µL	1.224E-1
6		STD 3 BOVINO	Standard	26.92	0.1 ng/µL	1.266E-1
7		STD 4 BOVINO	Standard	32.75	0.01 ng/µL	1.651E-02
8		STD 4 BOVINO	Standard	31.76	0.01 ng/µL	1.962E-02
9		STD 5 BOVINO	Standard	34.68	0.001 ng/µL	1.064E-03
10		STD 5 BOVINO	Standard	35.33	0.001 ng/µL	7.042E-04
11		STD 6 BOVINO	Standard	37.97	0.0001 ng/µL	1.314E-04
12		STD 6 BOVINO	Standard	39.85	0.0001 ng/µL	1.121E-04

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc	Calc Conc ng/µL
1		STD 1 OVINO	Standard	21.30	10 ng/µL	1.142E+1
2		STD 1 OVINO	Standard	21.49	10 ng/µL	1.131E+1
3		STD 2 OVINO	Standard	24.78	1 ng/µL	9.765E-1
4		STD 2 OVINO	Standard	25.56	1 ng/µL	9.141E-1
5		STD 3 OVINO	Standard	28.98	0.1 ng/µL	1.125E-1
6		STD 3 OVINO	Standard	28.37	0.1 ng/µL	1.158E-1
7		STD 4 OVINO	Standard	33.26	0.01 ng/µL	1.381E-02
8		STD 4 OVINO	Standard	33.23	0.01 ng/µL	1.404E-02
9		STD 5 OVINO	Standard	36.84	0.001 ng/µL	8.902E-04
10		STD 5 OVINO	Standard	35.69	0.001 ng/µL	1.243E-03
11		STD 6 OVINO	Standard		0.0001 ng/µL	
12		STD 6 OVINO	Standard	39.84	0.0001 ng/µL	1.203E-04

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc	Calc Conc ng/µL
1		ST 1 SUINO	Standard	15.18	10 ng/µL	1.113E+1
2		ST 1 SUINO	Standard	15.19	10 ng/µL	1.118E+1
3		ST 2 SUINO	Standard	20.50	1 ng/µL	9.021E-1
4		ST 2 SUINO	Standard	19.37	1 ng/µL	9.752E-1
5		ST 3 SUINO	Standard	25.22	0.1 ng/µL	1.115E-1
6		ST 3 SUINO	Standard	24.34	0.1 ng/µL	1.213E-1
7		ST 4 SUINO	Standard	33.54	0.01 ng/µL	2.019E-02
8		ST 4 SUINO	Standard	31.90	0.01 ng/µL	1.511E-02
9		ST 5 SUINO	Standard		0.001 ng/µL	
10		ST 5 SUINO	Standard	34.78	0.001 ng/µL	1.481E-03
11		ST 6 SUINO	Standard	39.54	0.0001 ng/µL	1.722E-04
12		ST 6 SUINO	Standard		0.0001 ng/µL	

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc	Calc Conc ng/µL
1		STD 1 EQUINO	Standard	23.03	10 ng/µL	1.274E+1
2		STD 1 EQUINO	Standard	23.54	10 ng/µL	1.375E+1
3		STD 2 EQUINO	Standard	26.65	1 ng/µL	9.781E-1
4		STD 2 EQUINO	Standard	26.37	1 ng/µL	9.857E-1
5		STD 3 EQUINO	Standard	29.23	0.1 ng/µL	1.442E-1
6		STD 3 EQUINO	Standard	29.00	0.1 ng/µL	1.451E-1
7		STD 4 EQUINO	Standard	32.60	0.01 ng/µL	1.418E-02
8		STD 4 EQUINO	Standard	32.23	0.01 ng/µL	1.423E-02
9		STD 5 EQUINO	Standard	36.88	0.001 ng/µL	1.127E-03
10		STD 5 EQUINO	Standard	36.21	0.001 ng/µL	1.178E-03
11		STD 6 EQUINO	Standard		0.0001 ng/µL	
12		STD 6 EQUINO	Standard		0.0001 ng/µL	

Figura 24. Rappresentazione grafica delle curve di taratura ottenute per ciascuna specie testata. Sono mostrate le relative rette di taratura con i parametri di Efficienza, Slope, Intercetta Y e coefficiente di correlazione R^2. Nella parte bassa della figura sono illustrate le tabelle relative alla modalità di costruzione delle rette di standard, con i valori di concentrazione forniti (ng/µL), i relativi Ct e la concentrazione fornita dallo strumento (ng/µL). Si tenga presente che 10 ng/µL equivale al 100%.

Realizzate le rette standard, la fase successiva è stata l'implementazione delle medesime curve di standard ripetute in un numero di 10 replicati per valore di concentrazione, al fine di valutare i parametri di sensibilità e specificità per ciascuna coppia primer-probe, oltre che la misurazione dei valori di LOD e del LOQ del saggio. La sensibilità e la specificità sono state calcolate utilizzando le seguenti espressioni:

Sensibilità % = Veri Positivi/ Veri Positivi + Falsi Negativi

Specificità % = Veri Negativi/ Veri Negativi + Falsi Positivi

La tabella 15 riporta schematicamente il valore di sensibilità calcolato per ciascuna specie e per ciascun rapporto di concentrazione, tenendo conto della capacità di individuare selettivamente il target. Sono inoltre riportati i valori di concentrazione di target ritrovati.

BOVINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 1: 10	10.681	-	1
MR 1: 10	10.850	-	
MR 1: 10	11.031	-	
MR 1: 10	11.086	-	
MR 1: 10	9.886	-	
MR 1: 10	10.237	-	
MR 1: 10	9.867	-	
MR 1: 10	10.189	-	
MR 1: 10	11.784	-	
MR 1: 10	10.873	-	
MR 2: 1	1.203	-	1
MR 2: 1	1.106	-	
MR 2: 1	0,877	-	
MR 2: 1	0,987	-	
MR 2: 1	0,968	-	
MR 2: 1	1.059	-	
MR 2: 1	1.195	-	
MR 2: 1	0,724	-	
MR 2: 1	0,872	-	
MR 2: 1	1.109	-	

BOVINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 3: 0,1	0,080	-	1
MR 3: 0,1	0,122	-	
MR 3: 0,1	0,098	-	
MR 3: 0,1	0,094	-	
MR 3: 0,1	0,142	-	
MR 3: 0,1	0,137	-	
MR 3: 0,1	0,074	-	
MR 3: 0,1	0,131	-	
MR 3: 0,1	0,191	-	
MR 3: 0,1	0,099	-	
MR 4: 0,01	0,013	-	1
MR 4: 0,01	0,012	-	
MR 4: 0,01	0,009	-	
MR 4: 0,01	0,017	-	
MR 4: 0,01	0,012	-	
MR 4: 0,01	0,009	-	
MR 4: 0,01	0,014	-	
MR 4: 0,01	0,016	-	
MR 4: 0,01	0,008	-	
MR 4: 0,01	0,079	-	

BOVINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 5: 0,001	0,0014	-	0,9
MR 5: 0,001	0,0013	-	
MR 5: 0,001	0,0009	-	
MR 5: 0,001	0,0013	-	
MR 5: 0,001	0,0011	-	
MR 5: 0,001	0,0009	-	
MR 5: 0,001	0,0007	-	
MR 5: 0,001	-	NEG	
MR 5: 0,001	0,0012	-	
MR 5: 0,001	0,0015	-	
MR 6: 0,0001	-	NEG	0,6
MR 6: 0,0001	0,00014	-	
MR 6: 0,0001	-	NEG	
MR 6: 0,0001	0,00013	-	
MR 6: 0,0001	-	NEG	
MR 6: 0,0001	0,00015	-	
MR 6: 0,0001	0,00011	-	
MR 6: 0,0001	-	NEG	
MR 6: 0,0001	0,0002	-	
MR 6: 0,0001	0,0005	-	

OVINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 1: 10	9,680	-	1
MR 1: 10	10,711	-	
MR 1: 10	11,073	-	
MR 1: 10	10,152	-	
MR 1: 10	10,923	-	
MR 1: 10	9,815	-	
MR 1: 10	10,223	-	
MR 1: 10	8,893	-	
MR 1: 10	9,897	-	
MR 1: 10	10,221	-	
MR 2: 1	0,934	-	1
MR 2: 1	0,953	-	
MR 2: 1	1,020	-	
MR 2: 1	0,955	-	
MR 2: 1	0,877	-	
MR 2: 1	0,991	-	
MR 2: 1	0,934	-	
MR 2: 1	0,967	-	
MR 2: 1	0,884	-	
MR 2: 1	0,892	-	

OVINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 3: 0.1	0,094	-	1
MR 3: 0.1	0,154	-	
MR 3: 0.1	0,112	-	
MR 3: 0.1	0,109	-	
MR 3: 0.1	0,115	-	
MR 3: 0.1	0,087	-	
MR 3: 0.1	0,109	-	
MR 3: 0.1	0,111	-	
MR 3: 0.1	0,090	-	
MR 3: 0.1	0,089	-	
MR 4: 0.01	0,012	-	1
MR 4: 0.01	0,007	-	
MR 4: 0.01	0,017	-	
MR 4: 0.01	0,013	-	
MR 4: 0.01	0,009	-	
MR 4: 0.01	0,008	-	
MR 4: 0.01	0,014	-	
MR 4: 0.01	0,012	-	
MR 4: 0.01	0,013	-	
MR 4: 0.01	0,087	-	

OVINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 5: 0.001	0,0012	-	0,9
MR 5: 0.001	0,0009	-	
MR 5: 0.001	0,0014	-	
MR 5: 0.001	0,0017	-	
MR 5: 0.001	0,0008	-	
MR 5: 0.001	0,0011	-	
MR 5: 0.001	0,0089	-	
MR 5: 0.001	0,0013	-	
MR 5: 0.001	-	NEG	
MR 5: 0.001	0,00098	-	
MR 6: 0.0001	0,00012	-	0,6
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	0,00014	-	
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	0,00011	-	
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	0,00015	-	
MR 6: 0.0001	0,00014	-	
MR 6: 0.0001	0,00016	-	

SUINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 1: 10	9,210	-	1
MR 1: 10	11,001	-	
MR 1: 10	9,830	-	
MR 1: 10	9,813	-	
MR 1: 10	10,520	-	
MR 1: 10	9,854	-	
MR 1: 10	9,785	-	
MR 1: 10	9,030	-	
MR 1: 10	9,878	-	
MR 1: 10	9,937	-	
MR 2: 1	0,850	-	1
MR 2: 1	0,894	-	
MR 2: 1	1,107	-	
MR 2: 1	0,879	-	
MR 2: 1	1,232	-	
MR 2: 1	0,937	-	
MR 2: 1	1,073	-	
MR 2: 1	0,961	-	
MR 2: 1	0,997	-	
MR 2: 1	1,121	-	

SUINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 3: 0.1	0,099	-	1
MR 3: 0.1	0,112	-	
MR 3: 0.1	0,088	-	
MR 3: 0.1	0,106	-	
MR 3: 0.1	0,089	-	
MR 3: 0.1	0,095	-	
MR 3: 0.1	0,101	-	
MR 3: 0.1	0,097	-	
MR 3: 0.1	0,121	-	
MR 3: 0.1	0,092	-	
MR 4: 0.01	0.009	-	1
MR 4: 0.01	0.019	-	
MR 4: 0.01	0,012	-	
MR 4: 0.01	0.008	-	
MR 4: 0.01	0.008	-	
MR 4: 0.01	0.015	-	
MR 4: 0.01	0.009	-	
MR 4: 0.01	0.014	-	
MR 4: 0.01	0.007	-	
MR 4: 0.01	0.011	-	

SUINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 5: 0.001	0.0009	-	0,7
MR 5: 0.001	-	NEG	
MR 5: 0.001	0.0012	-	
MR 5: 0.001	-	NEG	
MR 5: 0.001	0.0015	-	
MR 5: 0.001	-	NEG	
MR 5: 0.001	0.0013	-	
MR 5: 0.001	0,0014	-	
MR 5: 0.001	0.0009	-	
MR 5: 0.001	0.0012	-	
MR 6: 0.0001	-	NEG	0,2
MR 6: 0.0001	0,00012	-	
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	0,00011	-	
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	-	NEG	
MR 6: 0.0001	-	NEG	

EQUINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 1: 10	10,099	-	1
MR 1: 10	10,156	-	
MR 1: 10	9,562	-	
MR 1: 10	9,827	-	
MR 1: 10	10,064	-	
MR 1: 10	10,061	-	
MR 1: 10	9,980	-	
MR 1: 10	9,868	-	
MR 1: 10	10,124	-	
MR 1: 10	10,105	-	
MR 2: 1	1,099	-	1
MR 2: 1	1,156	-	
MR 2: 1	0,961	-	
MR 2: 1	1,002	-	
MR 2: 1	0,961	-	
MR 2: 1	1,061	-	
MR 2: 1	0,981	-	
MR 2: 1	0,869	-	
MR 2: 1	1,024	-	
MR 2: 1	0,995	-	

EQUINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 3: 0.1	0,066	-	1
MR 3: 0.1	0,071	-	
MR 3: 0.1	0,118	-	
MR 3: 0.1	0,113	-	
MR 3: 0.1	0,082	-	
MR 3: 0.1	0,086	-	
MR 3: 0.1	0,091	-	
MR 3: 0.1	0,083	-	
MR 3: 0.1	0,088	-	
MR 3: 0.1	0,089	-	
MR 4: 0.01	0,010	-	1
MR 4: 0.01	0,011	-	
MR 4: 0.01	0,013	-	
MR 4: 0.01	0,009	-	
MR 4: 0.01	0,016	-	
MR 4: 0.01	0,010	-	
MR 4: 0.01	0,014	-	
MR 4: 0.01	0,008	-	
MR 4: 0.01	0,012	-	
MR 4: 0.01	0,016	-	

EQUINO			
Valore noto (ng/µL)	Espressione del Risultato		Sensibilità
	Positivi (ng/µL)	Negativi	
MR 5: 0.001	0.0012	-	0,8
MR 5: 0.001	0.0011	-	
MR 5: 0.001	0.0009	-	
MR 5: 0.001	-	NEG	
MR 5: 0.001	0.0009	-	
MR 5: 0.001	0.0015	-	
MR 5: 0.001	0.0011	-	
MR 5: 0.001	-	NEG	
MR 5: 0.001	0.0012	-	
MR 5: 0.001	0.0014	-	
MR 6: 0.0001		NEG	0,1
MR 6: 0.0001		NEG	
MR 6: 0.0001		NEG	
MR 6: 0.0001	0,00017	-	
MR 6: 0.0001		NEG	
MR 6: 0.0001		NEG	
MR 6: 0.0001		NEG	
MR 6: 0.0001		NEG	
MR 6: 0.0001		NEG	
MR 6: 0.0001		NEG	

Tabella 15. Rappresentazione schematica dei 10 replicati per ciascuno valore della retta di standard. Sono riportati i valori di concentrazione dati e i relativi valori calcolati. Sensibilità equivalente a 1 si riferisce ad un valore del 100%. La specificità calcolata (dato non mostrato) è risultata tra il 90% e il 100% per tutte le specie testate utilizzando acqua come controllo negativo. MR: Materiale di Riferimento.

Analogamente, dai medesimi dati sono stati estrapolati i valori del limite di rilevabilità (LOD) e del limite di quantificazione (LOQ) del saggio. I valori di LOD sono stati determinati mediante due differenti approcci, quello visivo e quello del calcolo statistico. Precisamente, secondo la prima metodica, è stata determinata la più piccola quantità di target rilevabile per valori di Ct<40 calcolando l'intervallo minimo di concentrazione per cui almeno il 90% dei replicati ha dato esito positivo. Considerata pertanto la quasi assenza di segnale per lo standard 6 (10^{-4} ng/µL) in tutte le specie testate, il LOD, secondo tale approccio, è stato fissato nel range dello standard 5 (10^{-3} ng/µL) per la specie Bovina ed Ovina, ovvero entro il range dello standard 4 (10^{-2} ng/µL) per le specie Suina ed Equina. Il metodo statistico, applicato sia per il calcolo del LOD che per il LOQ, ha previsto l'impiego del parametro RSD (Deviazione Standard Relativa), in quanto non è possibile utilizzare il metodo IUPAC basato sul segnale emesso del bianco che, per natura stessa della tecnica, esprime un valore sempre pari a zero. Pertanto si usa tale parametro il quale è ottenuto mediante rapporto tra il valore di DS (Deviazione Standard) del gruppo di replicati e i valori medi di concentrazione di target del medesimo gruppo. In particolare, esso è stato calcolato sulla base dei valori di concentrazione degli standard 5 e 6, e di essi, è stato preso come misura di riferimento di LOD e LOQ quella concentrazione di standard al quale il valore di RSD calcolato è, rispettivamente, inferiore al 33% (RSD<0.33) e al 25% (RSD<0.25). Più in dettaglio, la stima del LOQ viene determinata come corrispondente al più basso valore di concentrazione del DNA bersaglio al quale la RSD è risultata <25%. È possibile inoltre stimare un livello assoluto di LOQ definito come il valore più alto tra le stime ricavate durante le ripetizioni effettuate. Per il calcolo dei parametri citati, è stata dunque applicata l'espressione riportata in figura 25 secondo quanto indicato dall'Istituto per i Materiali di Referenza e per le Misure della Commissione Europea (82) e i risultati per ciascuna specie riportati in tabella 16.

The LOD is given by:

$$LOD = \frac{4u_0}{1-4RSU^2}$$

u_o .....absolute standard uncertainty
RSU .....relative standard uncertainty

The LOQ is given by:

$$LOQ = \sqrt{\frac{u_0^2}{RSU_{MAX}^2 - RSU^2}}$$

u_o .....absolute standard uncertainty
RSU .....relative standard uncertainty
RSU_{MAX} .....largest acceptable relative standard uncertainty

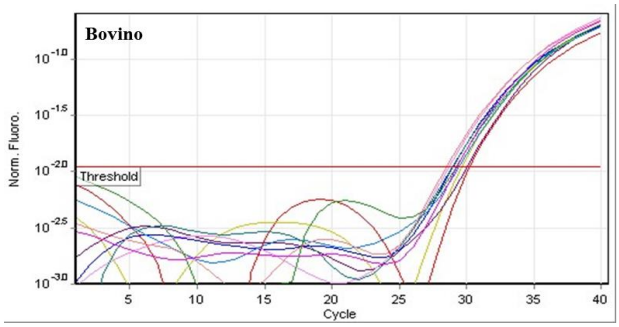
Figura 25. Calcolo del LOD secondo quanto suggerito dall'Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre, European Commission. μ_o: Deviazione Standard; RSU: Deviazione Standard Relativa (RSD). RSU_{MAX}: Valore massimo di RSD applicato per il test (0,25).

	BOVINO	**OVINO**	**SUINO**	**EQUINO**
Replicati	STD 5	STD 6	STD 5	STD 5
1	0,0014	0,00012	0.0009	0.0012
2	0,0013	-	-	0.0011
3	0,0009	-	0.0012	0.0009
4	0,0013	0,00014	-	-
5	0,0011	-	0.0015	0.0009
6	0,0009	0,00011	-	0.0015
7	0,0007	-	0.0013	0.0011
8	-	0,00015	0,0014	-
9	0,0012	0,00014	0.0009	0.0012
10	0,0015	0,00016	0.0012	0.0014
DS	0,00027	$1,8619*10^{-4}$	0,00023	0,00021
Media	0,0011	0,00014	0,0012	0,0012
RSD	0,232	0,136	0,192	0,184
LOD	**0.0013 ng/µL**	**0.0008 ng/µL**	**0.0010 ng/µL**	**0.0009 ng/µL**
LOQ	**0.0028 ng/µL**	**0.0009 ng/µL**	**0.0014 ng/µL**	**0.0012 ng/µL**

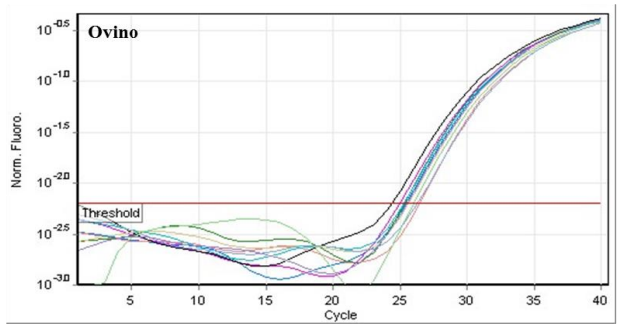
Tabella 16. La tabella riporta schematicamente i valori di LOD e LOQ per i quali rispettivamente RSD<0,33 e RSD<0,25 associati ai relativi valori di DNA Standard.

Ai fini della validazione del metodo, si è reso necessario stimare il parametro di ripetibilità del dato e, specificatamente quella di tipo intra-laboratorio, ovvero la concordanza tra risultati di prova ottenuti con lo stesso metodo sulla medesima matrice. Particolarmente, questa è stata valutata mediante esecuzione di 10 replicati per lo standard 2 per le specie Ovino ed Equino, ovvero per lo standard 3 per le specie Bovino e Suino (Figura 26). Il criterio di accettabilità di tale prova è stato fissato ad un valore di

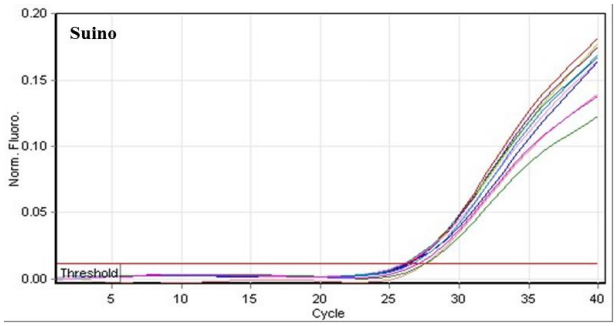
RSD<0.20 (20%), e in particolare oscillando da 0.015 per la specie equina a 0.032 per quella bovina.



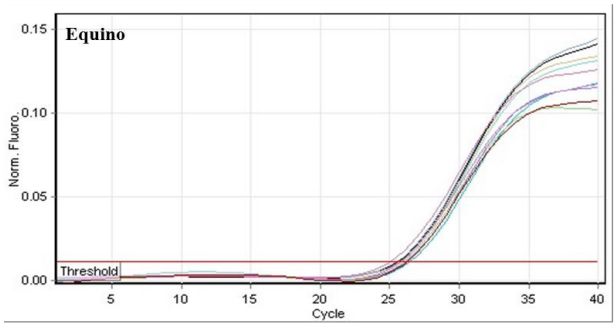
No.	Colour	Name	Type	Ct
1		STD 3	Unknown	25.26
2		STD 3	Unknown	24.67
3		STD 3	Unknown	24.03
4		STD 3	Unknown	26.01
5		STD 3	Unknown	24.81
6		STD 3	Unknown	25.63
7		STD 3	Unknown	24.92
8		STD 3	Unknown	25.02
9		STD 3	Unknown	25.86
10		STD 3	Unknown	23.33



No.	Colour	Name	Type	Ct
1		STD 2	Unknown	25.43
2		STD 2	Unknown	26.47
3		STD 2	Unknown	25.31
4		STD 2	Unknown	24.96
5		STD 2	Unknown	24.38
6		STD 2	Unknown	25.26
7		STD 2	Unknown	24.63
8		STD 2	Unknown	25.99
9		STD 2	Unknown	26.30
10		STD 2	Unknown	24.82



No.	Colour	Name	Type	Ct
1		STD 3	Unknown	26.36
2		STD 3	Unknown	26.08
3		STD 3	Unknown	26.35
4		STD 3	Unknown	26.45
5		STD 3	Unknown	26.03
6		STD 3	Unknown	26.68
7		STD 3	Unknown	26.08
8		STD 3	Unknown	27.58
9		STD 3	Unknown	27.59
10		STD 3	Unknown	27.09

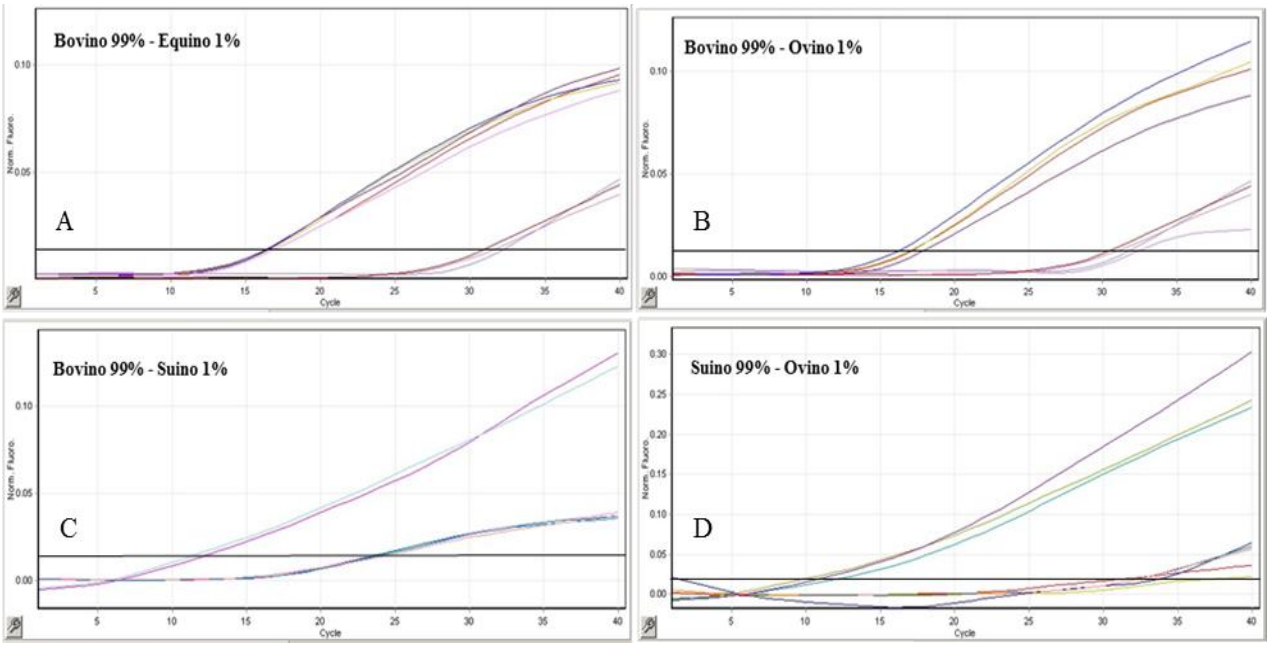


No.	Colour	Name	Type	Ct
1		STD 2	Unknown	25.70
2		STD 2	Unknown	26.50
3		STD 2	Unknown	25.73
4		STD 2	Unknown	26.11
5		STD 2	Unknown	25.91
6		STD 2	Unknown	25.56
7		STD 2	Unknown	26.19
8		STD 2	Unknown	25.87
9		STD 2	Unknown	25.06
10		STD 2	Unknown	26.28

Figura 26. Curve di ripetibilità intra-laboratorio a partire dalle curve di standard 2 e 3, rispettivamente 1 e 10^{-1} ng/µL e per i quali RSD<0.25.

La linearità delle reazioni è stata calcolata mediante stima del valore medio degli indici R^2 delle rette di regressione ottenute a partire dai campioni di standard a titolo noto di DNA bersaglio. Il criterio di accettabilità è stato fissato per un valore di $R^2 \geq 0{,}98$ e, precisamente oscillava da 0,973 per la specie bovina a 0.994 per quella equina, con un valore di R^2 medio finale di 0.985. A questo punto si è valutata l'amplificazione dei campioni di DNA estratti direttamente dalle misture carnee create a differente rapporto percentuale (peso/peso) e dal pool di DNA miscelati a differente percentuale a partire dai singoli estratti delle specie pure. Tale prova è stata eseguita per stimare quel valore di Ct corrispondente alla soglia dell'1% della specie inquinante, ovvero per stimarne la concentrazione di target presunta. I risultati hanno mostrato curve di amplificazione per tutte le misture carnee testate e da esse sono stati estrapolati i corrispondenti valori di Ct e di concentrazione mediante interpolazione dei dati con la curva di standard (Figura 27). Dall'analisi delle curve si nota come l'amplificazione del target 1% per le specie Suino (Figura 27, quadrante B, C e D), sia a bassa efficienza se comparato alla controparte nella specie pura, sia in termini di Ct che di fluorescenza emessa, ovvero di riproducibilità di ciascun replicato. Ulteriormente, si può osservare come le curve di amplificazione per la specie Ovino 1% (Figura 27, quadrante B e D) risultino differenti in termini di Ct e di emissione di fluorescenza nonostante la medesima, presunta, percentuale di target. Questo fenomeno è spiegato molto probabilmente dal fatto che la presenza concomitante di un differente DNA nella mistura ne influenza a diverso livello la loro amplificazione, determinando di fatto un andamento della curva diverso sebbene si tratti della medesima specie alla stessa percentuale. Più in dettaglio, si nota come l'amplificazione del target Ovino 1% nella mistura Suino/Ovino (Figura 27, quadrante D), sia a bassa efficienza, probabilmente a causa della potenziale "interferenza" del DNA della specie a maggiore concentrazione che di fatto ne influenza l'amplificazione e che, infatti, mostra il più alto livello di fluorescenza emesso (~0.30) non arrivando a plateau entro i 40 cicli programmati. Per quanto concerne la specie Bovino, i valori di Ct, anticipano, in tutte le prove eseguite, di qualche ciclo se comparati alla controparte della retta standard alla medesima concentrazione di target, mostrando inoltre differenze significative nei valori di Ct tra i gruppi Bovino/Equino e Bovino/Ovino Vs Bovino/Suino. In quest'ultima miscela infatti, il target bovino, oltre che mostrare un Ct precoce, non raggiunge la fase di

plateau al termine dell'amplificazione, presentando al contempo un elevato livello di fluorescenza emessa e dunque di DNA che, in accordo con quanto detto prima, probabilmente giustifica la bassa efficienza di amplificazione della specie suina nella medesima mistura (Figura 27, quadrante C). Tale fenomeno è presumibilmente dovuto alla maggiore concentrazione di tale specie nelle misture create, il quale, essendo ad elevata percentuale, è verosimilmente responsabile dell'efficacia di amplificazione del target della specie a bassa concentrazione, probabilmente dovuto a fenomeni di ingombro sterico o competitività. I fenomeni discussi sinora, sono anche spiegati dal fatto che la creazione della mistura è influenzata da una serie di fattori che condizionano la piena uniformità del campione (es. pesata del campione ed omogenizzazione) e quindi in grado di inficiare la relazione diretta tra il fattore percentuale, il ciclo soglia e la quantità di target. Evidenza di ciò risiede infatti nella visualizzazione di valori di Ct ritardati per tutte le specie all'1% quando comparati ai corrispettivi nelle curve di standard, essendo note le concentrazioni attese. Ad ogni modo, è comunque possibile rilevare una curva di amplificazione per le specie a percentuale minore all'interno delle misture e, di conseguenza, identificare quella soglia dell'1% prevista per assegnarne la positività alla specie inquinante.



Specie	Ct medio Mistura	Concentrazione DNA	Ct medio DNA Pool	Concentrazione DNA
Bovino 99%	16,65	15,76 ng/µL	17,24	15,22 ng/µL
Equino 1%	31,24	0,129 ng/µL	31,78	0,127 ng/µL
Bovino 99%	16,84	15,58 ng/µL	17,82	14,72 ng/µL
Ovino 1%	31,54	0,128 ng/µL	32,21	0,125 ng/µL
Bovino 99%	13,21	19,87 ng/µL	17,15	15,31 ng/µL
Suino 1%	24,88	0,12 ng/µL	27,35	0,109 ng/µL
Suino 99%	13,14	19,97 ng/µL	16,45	15,95 ng/µL
Ovino 1%	32,75	0,139 ng/µL	32,81	0,139 ng/µL

Figura 27. In alto, rappresentazione grafica delle curve di amplificazione per le misture carnee. In basso, tabella riassuntiva dei valori medi di Ct e di concentrazione ritrovati per ciascuna specie all'interno di ogni mistura e all'interno dei pool di DNA.

Dalla tabella mostrata in figura 27 si nota come i valori di Ct medi per le miscele di DNA siano differenti dai corrispettivi valori nelle misture create. Molto probabilmente tale fenomeno è ascrivibile alla maggiore purezza del DNA in quanto proveniente dalle estrazioni delle singole specie pure e quindi non soggetto a possibili errori di pesata e/o di omogenizzazione, fermo restando comunque la presenza di imprecisioni dei dati imputabili perlopiù alle fasi di pipettamento durante la preparazione delle miscele percentuali.

6.4 Analisi dei dati di Multiplex Real Time PCR

La metodica di Multiplex Real Time PCR ha previsto il disegno di un saggio duplex specificatamente progettato per le specie bovina, ovina e suina (saggio BOS) in grado di identificare in una singola reazione la presenza simultanea di due differenti target mediante impiego di sonde di tipo TaqMan MGB. Al fine di valutare la specificità della sola coppia di primer disegnata, la reazione, inizialmente, è stata mirata quindi alla verifica dell'assenza di eventuali dimeri di primer e prodotti aspecifici. Per fare ciò si è allestita una reazione di Real Time PCR che si è avvalsa dell'impiego dell'intercalante SYBR green e, in particolare, condotta mediante analisi delle curve di melting (Figura 28) a partire dagli estratti provenienti dalle specie pure. Dall'analisi dei dati, si nota come

tali curve hanno dimostrato l'assenza di prodotti spuri oltre i target determinando dunque la specificità della coppia di primer disegnati e, in particolare mostrando temperature di melting di 76.6°C, 76.1°C e 75.5°C rispettivamente per le specie Bovina, Ovina e Suina.

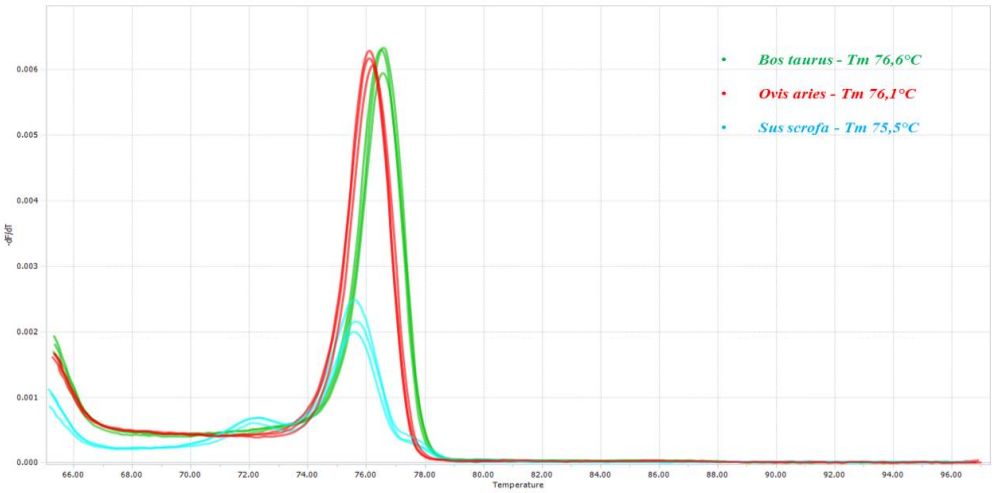


Figura 28. Analisi delle curva di melting per le specie bovina, ovina e suina.

Successivamente, si è passati alla valutazione degli amplificati impiegando in questa fase le sonde MGB specie-specifiche, per determinare la specificità di reazione e quindi valutarne l'efficienza di amplificazione del target (Figura 29). L'immagine mostra le curve di amplificazione per ciascuno gruppo di specie (in triplicato) insieme alle curve fornite dai controlli negativi (n=3). La concordanza dei valori di Ct registrati per le specie bovina, ovina e suina, cosi come l'andamento delle curve, ha messo in evidenza l'elevata efficienza della coppia primer/sonde disegnata per ciascuna specie, fornendo dunque un dato qualitativo relativamente alla capacità di individuazione del target specifico. Specificatamente sono stati registrati valori medi di Ct di 25.88, 26.25 e 26.29 rispettivamente per le specie Suina, Bovina e Ovina. Verificata a questo punto l'amplificabilità di ogni specie per la specifica sonda MGB, si è passati alla valutazione, anche in questo caso, della curva degli standard ottenuta a partire dalla specie pure.

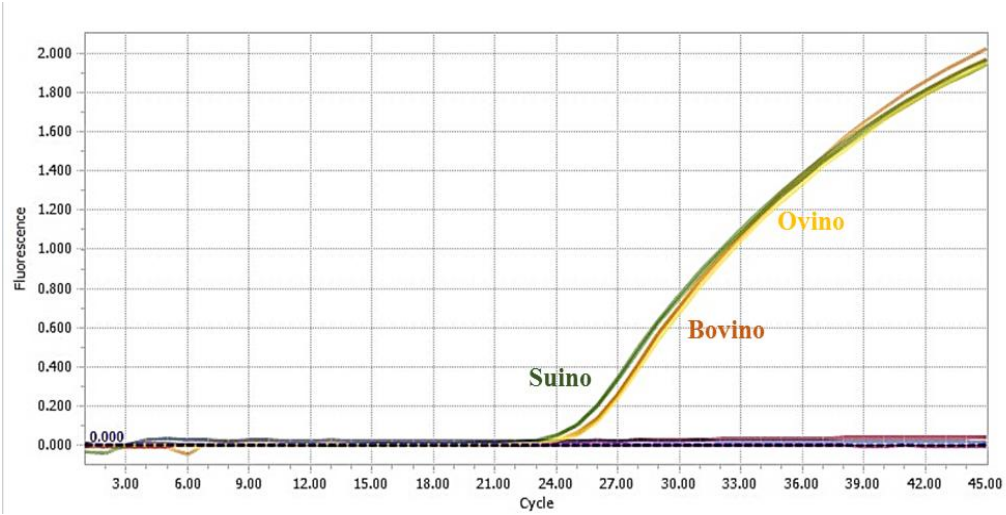


Figura 29. Rappresentazione grafica delle curve di Real Time ottenute per le matrici di riferimento Bovina, Ovina e Suina (soglia di Threshold settata a 0.20) ottenute impiegando le sonde MGB. Sono riportate inoltre le curve di amplificazione per i controlli negativi per ciascuna specie (n=3).

Come per le curve standard ottenute dalla precedente reazione di Real Time, anche in questo caso 10 replicati, a partire dagli estratti dalle specie pure, sono stati saggiati per ciascun valore di concentrazione, da 10^2 a 10^{-3} ng/µL. Dalla tabella 17 si nota come, sorprendentemente, a fronte di una ottima efficienza della coppia primer/sonde (Figura 29), non si ha amplificazione netta per nessuna specie per lo standard 6 (10^{-4} ng/µL) entro i 40 cicli. Specificatamente, si sono ottenute deboli curve di amplificazione oltre il 40° ciclo ma ritenute non significative e dunque non evidenziate.

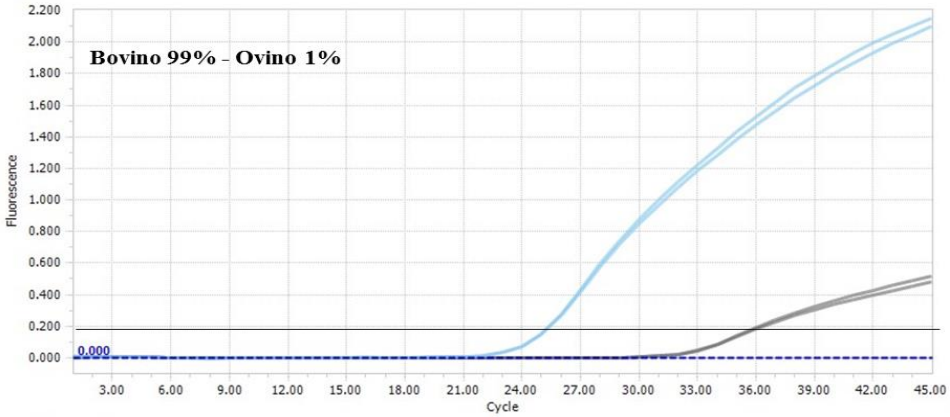
Standard	Concentrazione data	Ct medio	Concentrazione Media Calcolata
STD 1 BOV	10 ng/µL	25,71	$1,015*10^{1}$ ng/µL
STD 2 BOV	1 ng/µL	27,56	$9,290*10^{-1}$ ng/µL
STD 3 BOV	0,1 ng/µL	29,87	$1,012*10^{-1}$ ng/µL
STD 4 BOV	0,01 ng/µL	32,51	$1,164*10^{-2}$ ng/µL
STD 5 BOV	0,001 ng/µL	35,91	$1,103*10^{-3}$ ng/µL
STD 6 BOV	0,0001 ng/µL	na	na

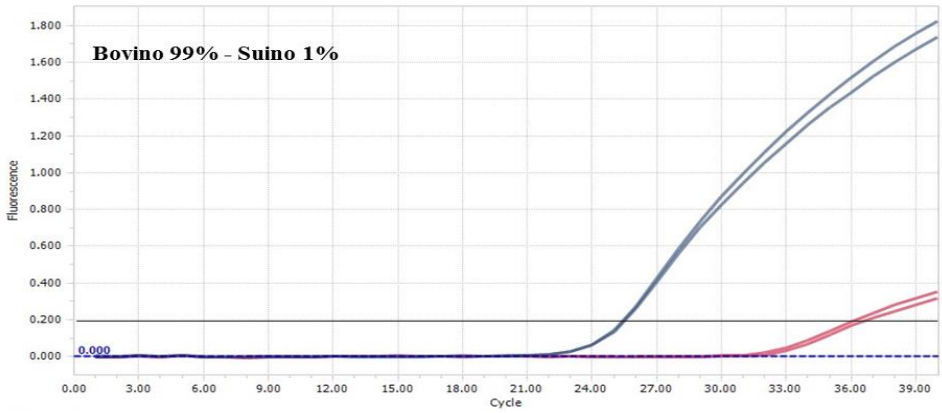
Standard	Concentrazione data	Ct medio	Concentrazione Media Calcolata
STD 1 OV	10 ng/µL	26,34	$1,011*10^{1}$ ng/µL
STD 2 OV	1 ng/µL	28,41	$9,010*10^{-1}$ ng/µL
STD 3 OV	0,1 ng/µL	30,98	$9,751*10^{-2}$ ng/µL
STD 4 OV	0,01 ng/µL	31,85	$1,188*10^{-2}$ ng/µL
STD 5 OV	0,001 ng/µL	34,48	$1,114*10^{-3}$ ng/µL
STD 6 OV	0,0001 ng/µL	na	na

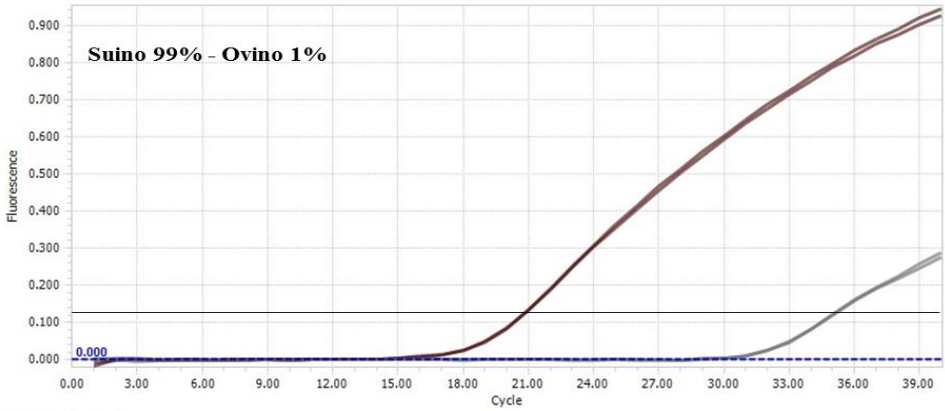
Standard	Concentrazione data	Ct medio	Concentrazione Media Calcolata
STD 1 SUI	10 ng/µL	26,57	$0,9821*10^{1}$ ng/µL
STD 2 SUI	1 ng/µL	27,66	$9,354*10^{-1}$ ng/µL
STD 3 SUI	0,1 ng/µL	30,15	$9,581*10^{-2}$ ng/µL
STD 4 SUI	0,01 ng/µL	33,15	$1,143*10-^{2}$ ng/µL
STD 5 SUI	0,001 ng/µL	35,11	$1,094*10^{-3}$ ng/µL
STD 6 SUI	0,0001 ng/µL	na	na

Tabella 17. Rappresentazione schematica dei valori di Ct e di concentrazione di target rilevata dallo strumento per la costruzione delle rette di standard per le specie bovina, ovina e suina.

A questo punto, dopo avere allestito le curve di standard, si è proceduti con il saggio di multiplex PCR per le misture carnee e per i pool di DNA da essi creati. Anche in questo caso, l'impiego delle curve di taratura è finalizzato all'acquisizione di un dato quantitativo dei target di DNA nelle miscele, per interpolazione dei dati di Ct della specifica curva. Dall'analisi delle curve si nota come l'amplificazione dei target 99% e 1% produca dei segnali di positività ad elevata efficienza in termini di riproducibilità e fluorescenza emessa (Figura 30). Solo la curva di amplificazione Suino/Ovino mostra valori di fluorescenza massima quasi dimezzata rispetto alle curve di amplificazione delle altre due misture. Anche in questo caso si evidenzia come i Ct delle specie a maggiore concentrazione anticipano di qualche ciclo, seppure di poco, quando comparati alla controparte nella specie pura alla medesima presunta concentrazione di target. Di contro, i valori di Ct per le specie target all 1% presentano uno shift in avanti significativo se comparato alla controparte nella specie pura, sia in termini di Ct che di fluorescenza emessa, mostrando però una ottimo livello di riproducibilità di ciascun replicato.







Specie	Ct medio Mistura	Concentrazione DNA	Ct medio DNA Pool	Concentrazione DNA
Bovino 99%	25,22	11,43 ng/µL	26,31	10,95 ng/µL
Ovino 1%	35,78	0,839 ng/µL	36,21	0,827 ng/µL
Bovino 99%	25,31	11,38 ng/µL	26,58	10,87 ng/µL
Suino 1%	36,24	0,791 ng/µL	37,12	0,771 ng/µL
Suino 99%	21,05	13,37 ng/µL	23,41	12,03 ng/µL
Ovino 1%	35,15	0,854 ng/µL	36,55	0,852 ng/µL

Figura 30. In alto, rappresentazione grafica delle curve di amplificazione in duplex per le misture carnee mediante impiego delle sonde MGB. In basso, tabella riassuntiva dei valori medi di Ct e di concentrazione ritrovati per ciascuna specie all'interno di ogni mistura e all'interno dei pool di DNA.

Come per le reazioni precedenti, tale fenomeno nel saggio duplex è dovuto probabilmente alla presenza concomitante di una differente percentuale di DNA nella mistura e alla presenza di una doppia sonda, che di fatto ne influenza l'amplificazione, determinando pertanto un andamento della curva diverso sebbene si tratti della medesima specie alla stessa percentuale, presunta, di target. In aggiunta, fenomeni di ingombro sterico, di competitività delle sonde per i rispettivi target e dei primer per i medesimi bersagli, sono responsabili delle variazioni di Ct e della bassa espressione di fluorescenza delle specie all'1% in tutte le curve prodotte se comparate alla quota 99% nella medesima reazione. Particolarmente, tale fenomeno è molto accentuato nella i) mistura Bovino/Ovino in cui si nota una variazione di fluorescenza tra le curve di un valore di circa 10 volte maggiore per la specie Bovina 99% e ii) nella curva per la specie Suino 99% in cui si evidenzia un valore di Ct piuttosto precoce. Nonostante possa essere evidenziata una certa omogeneità nei valori di Ct per tutte le specie testate, si nota però come tutte le curve non raggiungano la fase di plateau entro i 40-45 cicli, per cui aggiustamenti in tal senso prevederanno una riduzione della concentrazione delle sonde nella miscela. Come gia evidenziato, tale fenomeno è presumibilmente dovuto alla maggiore concentrazione di tali specie nelle misture create, le quali, sono verosimilmente responsabili dell'efficacia di amplificazione del target della specie a bassa concentrazione. Analogamente alle precedenti analisi di Real Time, i fenomeni che inficiano l'andamento delle curve di amplificazione discussi sinora, sono dovuti alle fasi di preparazione della mistura in sé in quanto influenzata da una serie di fattori che condizionano la piena uniformità del campione, quali pesata del campione ed omogenizzazione. Anche per il saggio duplex, ad ogni modo, è comunque possibile rilevare una curva di amplificazione per la specie all'1% all'interno delle misture e, di conseguenza, identificare quella soglia minima prevista per l'assegnazione della positività. L'analisi del saggio duplex è stata rivolta anche alla verifica di eventuali reazioni di cross reattività per le specie Equina, Pollo e Tacchino, ovvero escludere la presenza di un amplificato quando le sonde specie-specifiche venivano aggiunte alle mix di reazione contenente i target Bovino, Ovino e

Suino. Dai dati riportati in tabella 18 si nota come, alla concentrazione del target aspecifico di 10 ng/µL, si ha debole cross reattività della specie Ovino con le specie Pollo e Tacchino intorno al 40° ciclo sui 45 programmati. La ragione di ciò potrebbe risiedere nella brevità della sequenza nucleotidica della sonda MGB per la specie ovina per la quale una regione di potenziale e parziale complementarietà viene ritrovata quando, a determinate concentrazioni, essa viene "forzatamente" spinta all'ibridazione con dei target non specifici e simili filogeneticamente quali pollo e tacchino (Figura 31). Non è comunque esclusa l'ipotesi che possa trattarsi di idrolisi della sonda.

Probe	Bovino	Ovino	Suino	Equino	Pollo	Tacchino
Bovino	+	-	-	-	-	-
Ovino	-	+	-	-	+	+
Suino	-	-	+	-	-	-

Tabella 18. Rappresentazione schematica dei dati di cross reattività rintraciati mediante impiego delle sonde MGB. + Positivo al target; - Negativo al target.

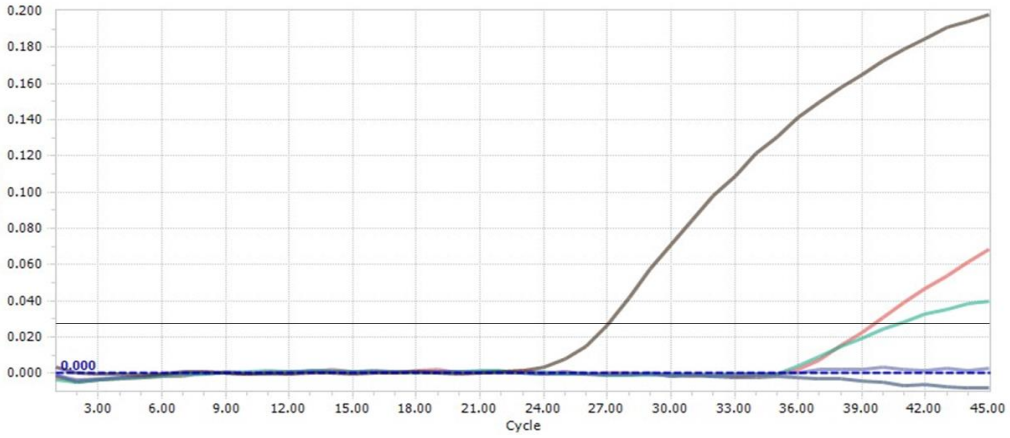


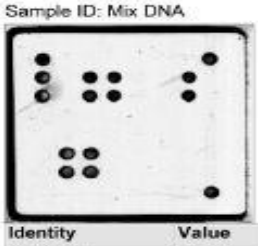
Figura 31. Rappresentazione grafica della curva di cross reattività osservata per l'amplificazione selettiva della specie Ovino (grigia) con le specie Pollo (fucsia) e Tacchino (celeste).

6.5 Analisi dei dati di Array e Real Time PCR per la matrici commerciali

L'impiego del metodo di screening mediante chip di array è risultato di fondamentale importanza nell'applicazione della procedura di identificazione genetica per le matrici commerciali (n=25), in quanto la manipolazione fraudolenta di un alimento può coinvolegere un ampio panorama di specie che tuttavia può sfuggire alla rilevazione con il saggio di Real Time PCR se non progettato ad hoc. Le indagini sono state condotte sulla base di quanto riportato in etichetta e pertanto i DNA, estratti da ciascun prodotto, sono stati dapprima screenati mediante saggio array ed, eventualmente, amplificati specificatamente per i target di cui risultavano composti mediante Real Time singleplex e duplex. Nello specifico, le analisi di Real Time PCR condotte su tali campioni sono state di tipo qualitative e secondarie allo screening con il chip di DNA array. Come previsto infatti dalla procedura operativa del laboratorio, solo in caso di positività ad una delle specie non dichiarate, si procede, quando possibile, con la metodica semiquantitativa per la sua stima percentuale. Il primo step è stato la verifica del metodo di array all'interno del laboratorio impiegando come target miscele di DNA a partire dalle specie pure e certificate di Bovino, Ovino, Suino, Equino, Pollo e Tacchino. A tale scopo due chip di array sono stati impiegati (inclusi un controllo negativo per array), in modo da ottenere un dato accurato e riproducibile. In figura 32 è possibile osservare come la miscela di DNA impiegata per l'ibridazione specifica abbia fornito esito positivo per tutte le specie testate, dimostrando pertanto la validità della metodica nel rintracciare simultaneamente e senza interferenze né cross reazioni le specie desiderate. In particolare, dalla figura è possibile visualizzare per tutti i campi di ibridazione (incluso il controllo negativo) tre spot, rispettivamente nell'angolo in alto a destra, in alto a sinistra e in basso a destra, i quali rappresentano i controlli di ibridazione. Oltretutto, in ciascuno degli 8 array, la sonda per la specifica specie animale è disposta in doppio, cosicché la presenza di ogni segnale di ibridazione specifico dà luogo ad un segnale evidenziabile come positività a due spot disposti in verticale. Nel caso in cui invece si manifesti un solo spot per positività alla specie o i riferimenti dei controlli di ibridazione non diano tutti e 3 i segnali richiesti, il dato, come indicato dalla ditta produttrice, non è stato considerato valido. Più in dettaglio, lo scanner effettua una lettura densitometrica degli spot assegnando un

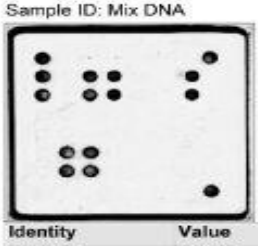
valore numerico direttamente proporzionale all'intensità dei segnali rilevati e derivato dalla media delle due misure assegnate.

Sample ID: Mix DNA



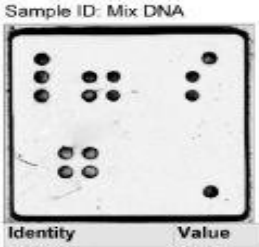
Identity	Value
Hyb-Ctrl	54172
Beef	43791
Pork	54802
Sheep	55332
Chicken	48731
Turkey	49055
Horse	52486

Sample ID: Mix DNA



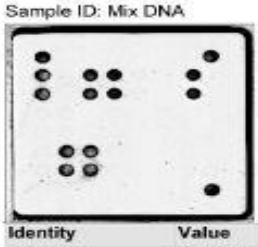
Identity	Value
Hyb-Ctrl	53622
Beef	51566
Pork	52061
Sheep	56793
Chicken	45477
Turkey	46642
Horse	53021

Sample ID: Mix DNA



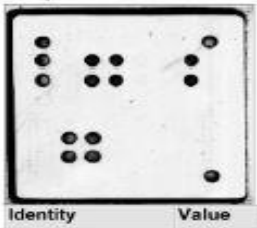
Identity	Value
Hyb-Ctrl	52726
Beef	47675
Pork	50730
Sheep	51288
Chicken	41167
Turkey	38249
Horse	53961

Sample ID: Mix DNA



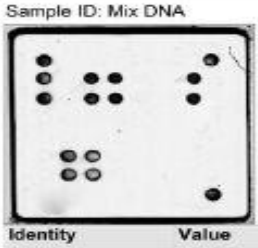
Identity	Value
Hyb-Ctrl	54866
Beef	44049
Pork	52093
Sheep	56888
Chicken	45246
Turkey	40184
Horse	52213

Sample ID: Mix DNA



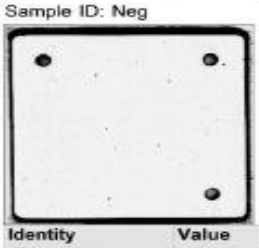
Identity	Value
Hyb-Ctrl	49129
Beef	45939
Pork	52825
Sheep	52496
Horse	52586
Chicken	35068
Turkey	29126

Sample ID: Mix DNA



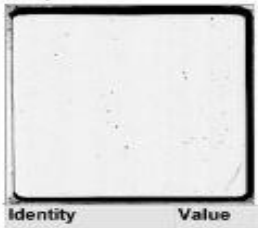
Identity	Value
Hyb-Ctrl	52060
Beef	48118
Pork	54132
Sheep	56128
Chicken	43484
Turkey	35811
Horse	52356

Sample ID: Neg

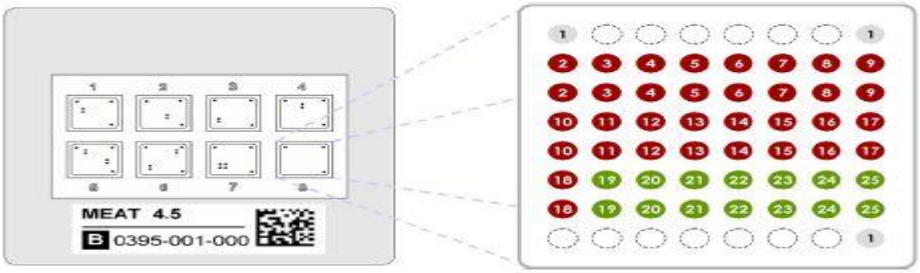


Identity	Value
Hyb-Ctrl	48713

Sample ID:



Identity	Value



No.	Name	*Species*	No.	Name	*Species*
01	Hyb-Ctrl	Hybridization Control			
02	Beef *	*Bos taurus*	14	Red Deer	*Cervus elaphus*
03	Dog/Wolf	*Canis lupus sp.*	15	Axis Deer	*Cervus axis / Axis axis*
04	Pork	*Sus scrofa*	16	Fallow Deer	*Dama dama*
05	Sheep	*Ovis aries*	17	Reindeer	*Rangifer tarandus*
06	Goat	*Capra hircus*	18	Springbok	*Antidorcas marsupialis*
07	Buffalo	*Bubalus bubalis*	19	Chicken	*Gallus gallus*
08	Horse	*Equus caballus*	20	Turkey	*Meleagris gallopavo*
09	Cat **	*Felis cattus*	21	Goose	*Ansa albifrons*
10	Hare	*Lepus europaeus*	22	Mallard Duck	*Anas platyrhyncos*
11	Rabbit	*Oryctolagus cuniculus*	23	Muscovy Duck	*Cairina moschata*
12	Kangaroo	*M. giganteus / M. rufus*	24	Pheasant	*Phasianus cholchicus*
13	Roe Deer	*Capreolus capreolus*	25	Ostrich	*Struthio camelus*

Figura 32. In alto, rappresentazione grafica del report di ibridazione generato dallo strumento Scanner. Sono evidenziati gli spot di positività in doppio per ciascuna specie. In basso è riportata la mappa di lettura indicante le specifiche posizioni delle sonde di ibridazione sull'array.

Tale valore, non può pertanto rappresentare una quantificazione assoluta, ma relativa alla intensità del segnale emesso dalla miscela di controllo. Seguendo il protocollo operativo del kit un valore di cut off tra 1500 e 3000 è stato impostato nella lettura dell'array per tener conto dell'eventuale effetto matrice. Ulteriormente, il valore di cut-off per tale lavoro è stato settato a 3500 per compensare effetti di variabilità intralaboratorio, equivalente secondo la ditta produttrice, ad un LOD compreso nel range 0.1 - 0.5%. Successivamente alla verifica del saggio, la metodica è stata quindi applicata ai prodotti commerciali come screening identificativo delle specie costituenti le matrici. L'analisi degli spot di ibridazione per tutti i campioni testati per le specie dichiarate e non, ha mostrato dei dati interessanti relativamente alle specie rintracciate (Tabella 19). Nello specifico, a fronte di 25 campioni analizzati, più di 1/3 di essi ha evidenziato la presenza di una o più specie non dichiarate nelle specifiche del prodotto o dal produttore (10/25, 40%). All'interno di tale gruppo, 5 campioni sui 10 adulterati sono risultati positivi anche ad una contaminazione per la specie pollo (50%) mentre 4 su 10 da quella suina (40%). Nessuno dei campioni analizzato ha mostrato invece positività alla specie equina e solo un campione ha evidenziato positività alla specie tacchino. Deboli positività alle specie pollo e tacchino, non rilevanti in termini di cut-off, sono state evidenziate anche per altri campioni ma non sono state considerate significative e pertanto non riportate nel computo totale. La figura 33 riporta alcune immagini per i saggi di ibridazione.

			Specie Ritrovata					
Nr Progressivo	**Matrice**	**Specie Dichiarata**	**Bovino**	**Ovino**	**Suino**	**Equino**	**Pollo**	**Tacchino**
1	Tortelloni al ripieno di carne	SUINO	-	-	+	-	-	-
2	Tortelloni al ripieno di carne	SUINO	-	-	+	-	-	+
3	Ragù di carne	BOVINO/SUINO	+	-	+	-	+	-

4	Ragù di carne	BOVINO/SUINO	+	-	+	-	-	-
5	Preparato a base di carne	SUINO	-	-	+	-	-	-
6	Carne in scatola	BOVINO	+	-	-	-	-	-
7	Hamburger	BOVINO	+	-	-	-	-	-
8	Salame	SUINO	+	-	+	-	-	-
9	Salame	SUINO	-	-	+	-	-	-
10	Carne macinata	BOVINO	+	-	-	-	+	-
11	Salsicce fresche	SUINO	+	-	+	-	+	-
12	Carne macinata	BOVINO	+	-	+	-	+	-
13	Salsiccia	SUINO	-	-	+	-	+	-
14	Carne macinata	BOVINO	+	-	+	-	-	-
15	Carne in scatola	BOVINO	+	-	-	-	-	-
16	Hamburger	BOVINO	+	-	+	-	-	-
17	Ragu di carne	BOVINO/SUINO	+	-	+	-	-	-
18	Carne in scatola	BOVINO	+	-	-	-	-	-
19	Tortellini carne	SUINO	-	-	+	-	-	-
20	Tortellini carne	BOVINO/SUINO	+	-	+	-	-	-
21	Cannelloni ragu	BOVINO/SUINO	+	-	+	-	-	-
22	Hamburger	BOVINO	+	-	+	-	-	-
23	Hamburger	BOVINO	+	-	-	-	-	-
24	Salsiccia	SUINO	-	-	+	-	-	-
25	Preparato a base di carne	SUINO	-	-	+	-	-	-

Tabella 19. Rappresentazione schematica dei dati di positività (+) e negatività (-) per le matrici commerciali testate (n=25). Sono evidenziate in giallo le positività a tutte le specie ritrovate all'interno della matrice testata.

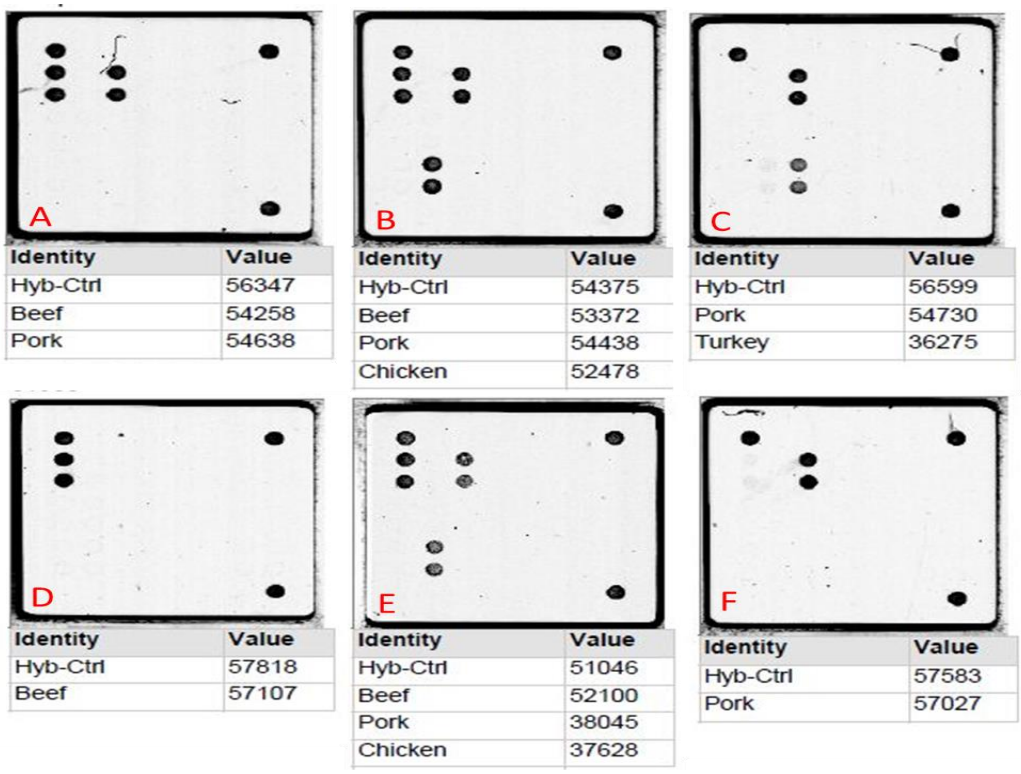


Figura 33. Rappresentazione grafica dei report di ibridazione per le matrici commerciali testate (n=25). Sono riportate a titolo esemplificativo specificatamente le matrici: A) Hamburger, dicharato specie Bovino; B) Salsiccia fresca, dichiarata specie Suino; C) Tortelloni al ripieno di carne, dichiarata specie Suino; D) Carne in scatola, dichiarata specie Bovina; E) Ragù di carne, dichiarato specie Bovino/Suino; F) Tortellini carne, dichiarata specie Suino.

Dopo la fase di screening si è passati dunque all'analisi in Real Time PCR mediante saggio singleplex e duplex. Tali metodiche sono state impiegate soltanto per quelle positività per la quale i metodi di validazione sono stati applicati. Specificatamente, le analisi di Real Time hanno riguardato esclusivamente quelle matrici alimentari i cui contenuti non dichiarati riguardavano quelle specie animali validate internamente secondo la metodica sopra descritta e quindi inerenti le specie bovina, ovina, suina ed equina. Data l'assenza di positività per le specie ovina ed equina in tutti i campioni testati nella fase di screening, le analisi quantitative si sono concentrate per i rimanenti 6 campioni in cui il contaminante era rappresentato dalla specie suina o bovina e per esse sono stati verificati i valori di Ct del target inquinante per la verifica della soglia 1% (Tabella 20). In particolare, ciascuno di questi è stato quindi testato utilizzando come riferimento quantitativo le misture all'1% specifiche per la specie da ricercare. Tale

sistema di analisi è stato applicato seguendo le direttive EURL-AP, in quanto la conferma di positività è data dal confronto del valore di Ct per la specie inquinante con il campione di riferimento contenente l'1% del medesimo target.

			Specie Ritrovata	
Nr Progressivo	**Matrice**	**Specie Dichiarata**	**Bovino**	**Suino**
8	Salame	SUINO	+	+
11	Salsicce fresche	SUINO	+	+
12	Carne macinata	BOVINO	+	+
14	Carne macinata	BOVINO	+	+
16	Hamburger	BOVINO	+	+
22	Hamburger	BOVINO	+	+

Tabella 20. Rappresentazione schematica dei campioni saggiati mediante Real Time PCR. Sono evidenziate in giallo le positività alle specie non dichiarate in etichetta o dal produttore.

L'analisi delle curve di amplificazione per i campioni descritti in tabella 20, condotte sia come saggi singleplex che come multiplex, ha confermato la presenza delle sostanze inquinanti rilevate allo screening (Figura 34). Come già messo in evidenza dagli elevati valori di positività all'analisi dei dati di array, le curve di amplificazione hanno mostrato analoghi segnali di positività per le sostanze inquinanti gia ai primi cicli di amplificazione, talvolta anche di intensità eguale o di poco dissimile se comparato alla curva dell'ingrediente principale dichiarato. Tale analisi riflette dunque l'intensità della contaminazione e, in particolare, risulta abbastanza chiaro come i valori di Ct per la sostanza adulterante nei campioni saggiati siano di molto inferiore al Ct del campione di riferimento 1% per la medesima specie, evidenziando dunque il superamento della frazione di massa consentita e l'assegnazione pertanto della positività a quel dato contaminante. Solo per il campione C in figura 34, si può osservare una debole positività prossima all'1% dell'inquinante bovino, sufficiente comunque a determinare il superamento della soglia di riferimento.

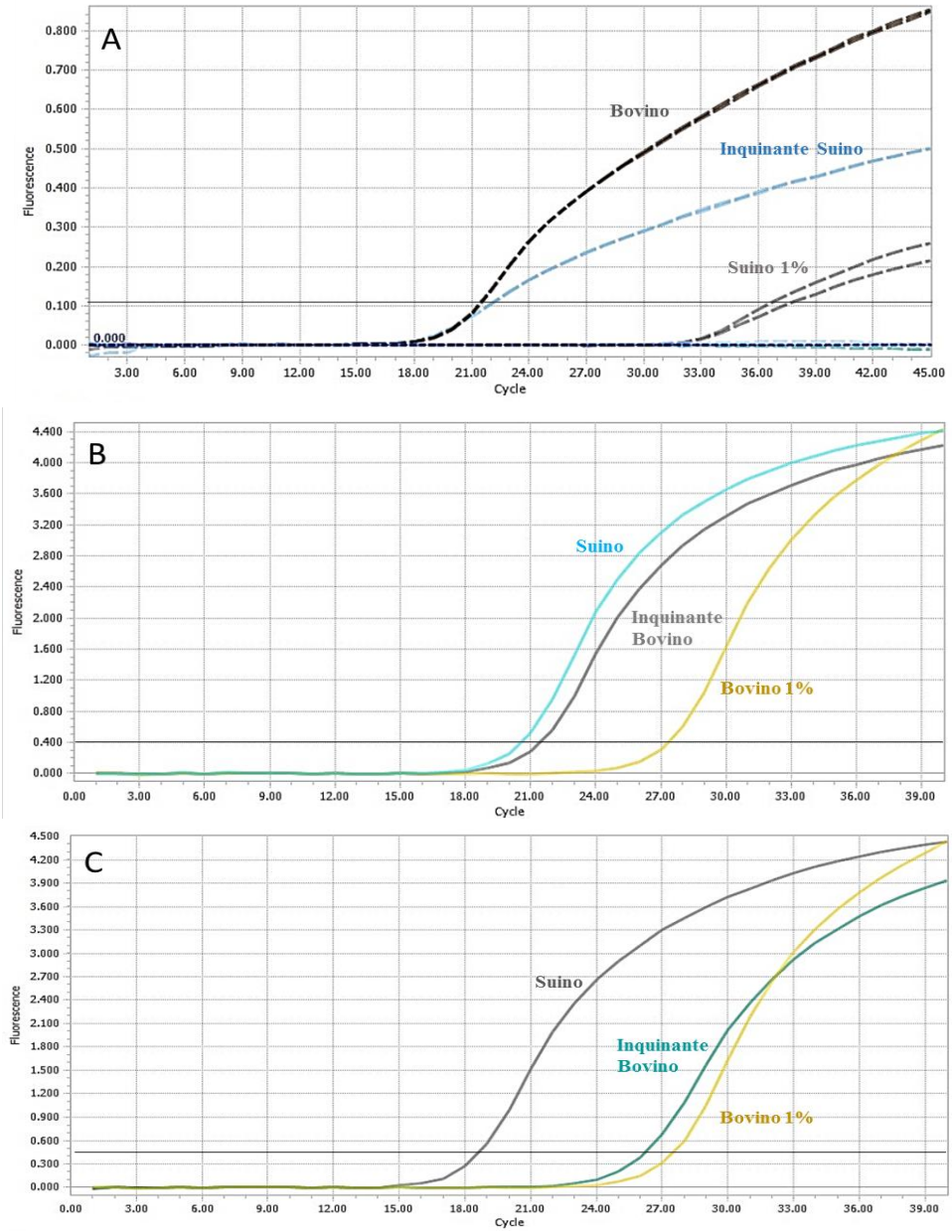


Figura 34. Rappresentazione grafica delle curve di amplificazione per le matrici commerciali A (duplex), B e C (singleplex).

A: Hamburger, dichiarato di specie Bovino. Sono rappresentate le curve di amplificazione per la specie Bovino e per l'inquinante Suino ottenute mediante saggio duplex; È riportata la curva di amplificazione della mistura Suino all'1% ottenuta mediante sonda MGB specifica in singleplex.

B e C: Rispettivamente Salsicce fresche e Salame dichiarati entrambi di specie Suino. Sono rappresentate le curve di amplificazione per la specie Suino e per l'inquinante Bovino ottenute entrambe mediante saggio singleplex. Sono riportate per entrambe le curve di amplificazione la mistura Bovino 1% ottenuta anch'essa tramite sonda specifica in saggio singleplex.

6.6 Analisi dei marcatori STR

Lo studio di genotracciabilità è stato effettuato su un numero compessivo di 112 campioni di bovino provenienti da 8 differenti aziende del territorio su richiesta dei servizi veterinari. Per la verifica di identità genetica sono stati analizzati i profili genetici in relazione alla distribuzione dei marcatori STR ed eleaborati gli elettroferogrammi per l'accertamento della corrispondenza dei capi. I singoli alleli sono stati identificati mediante analisi degli elettroferogrammi al software GeneMapper e, particolarmente, mediante visualizzazione di un picco di fluorescenza plottato su una scala di pesi molecolari crescenti; ciascuno picco rappresenta un allele il quale è definito da un numero indicante il peso molecolare del frammento attribuito sulla base di un ladder di pesi molecolari. I campioni analizzati risultavano costituiti da tessuto muscolare e da campioni ematici, di cui alcuni prelevati direttamente in azienda (ante-mortem) e altri al mattatoio in fase post-mortem e confrontati con i rispettivi, presunti, campioni ematici prelevati dal medesimo animale in tempi differenti o quando esso era ancora in vita al fine di accertare se eventuali irregolarità erano gia in atto. Dai dati analizzati è emerso che che solo 4 aziende su 8 risultavano pienamente in regola per le analisi genetiche. In particolare, in figura 35 è riportato parte di un elettroferogramma di identità ritrovato per due capi analizzati e uno di non identità genetica dovuto alla difformità allelica ad un solo locus. La tabella 21 riporta invece le irregolarità complessive riscontrate durante le analisi, evidenziando dunque come alcune difformità erano già messe in atto da parte dell'allevatore. Nello specifico, la non identità genetica ha riguardato i) 3 campioni ematici prelevati in azienda a differenti intervalli di tempo e per i quali alcuni di essi erano già disponibili presso i laboratori IZS a seguito di precedenti attività di controllo e ii) 2 campioni di tessuto muscolare prelevati in fase post mortem al mattatoio. La comparazione del profilo genetico tra gli individui è stata eseguita valutando le percentuali di omologia dei loci considerati tra i capi in oggetto, applicando una correzione di più o meno un allele. Precisamente, due profili genetici sono stati attribuiti al medesimo capo e dunque definita un'identità genetica quando un'omologia del 100% veniva riscontrata a tutti gli alleli dei due soggetti in esame. Affinchè il dato abbia però validità è necessario che il confronto allelico tenga conto della differente rappresentatività di quel dato allele all'interno della popolazione di riferimento. Pertanto, a partire dalle

frequenze alleliche per ciascun locus, sono state calcolate per esso le frequenze genotipiche e quindi la Probabilità di Identità (PI) per tutti i genotipi e, infine, la Random Match Probability (RMP) come rapporto 1/PI. Per il pannello di marcatori impiegato, tale parametro ha fornito valori medi equivalenti ad 1 probabilità su 5 mila miliardi che due campioni aventi lo stesso profilo allelico provengano in realtà da due individui differenti, attestando pertanto l'attendibilità del saggio.

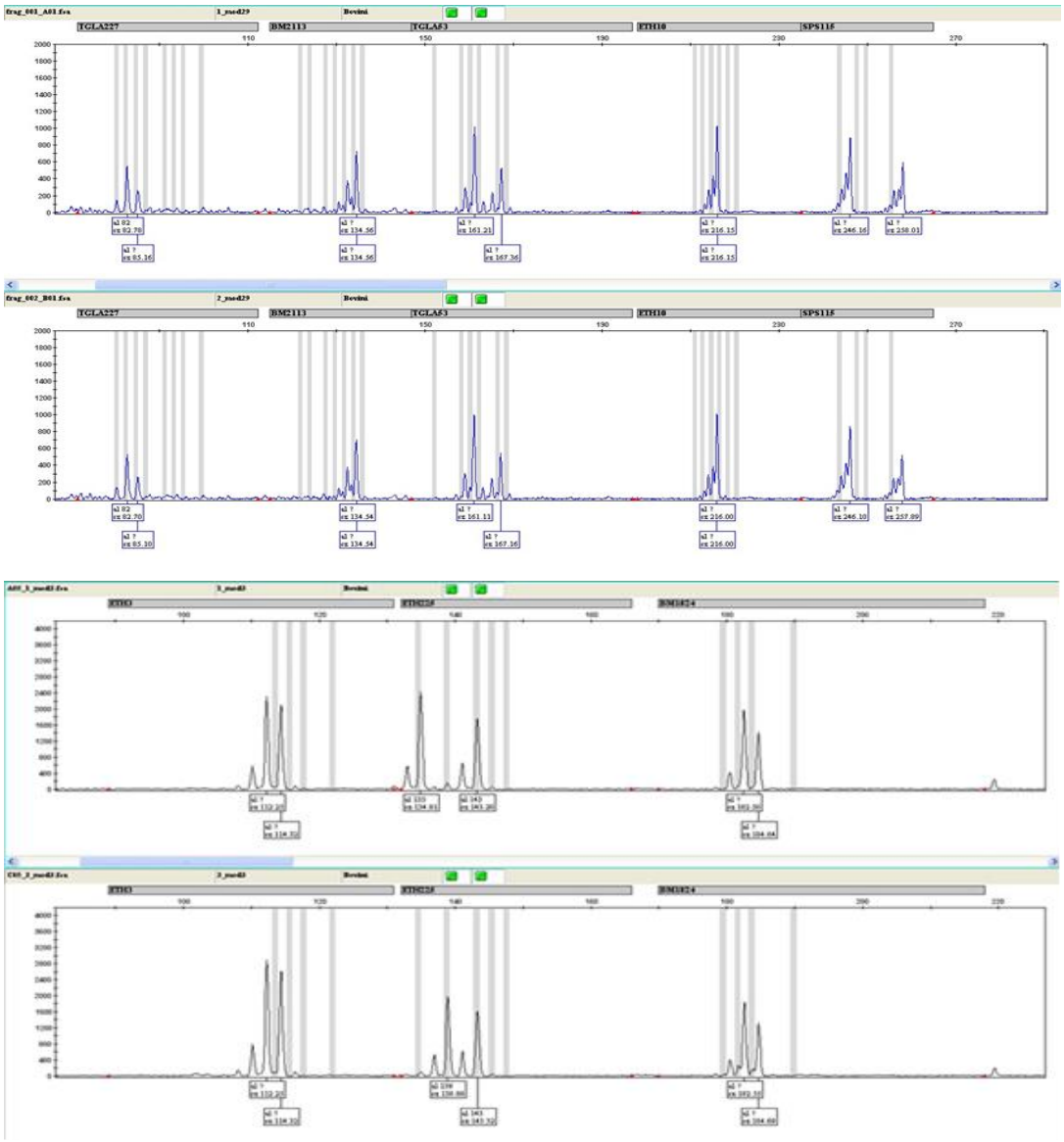


Figura 35. Rappresentazione grafica di due elettroferogrammi praziali relativi ad un caso di identità (Blu) e uno di non identità (Nero). Si nota nel primo caso l'esatta corrispondenza genetica tra i loci a confronto a piu o meno un allele di differenza. Nel secondo caso, in basso, si apprezza la differenza genetica per difformità ad un solo allele.

Nr. Campioni	Matrice Riferimento (n)	Matrice Controllo (n)	Match Genetico	Luogo Campionamento
14	Emosiero (7)	Muscolo (7)	7/7	Mattatoio
10	Emosiero (5)	Emosiero (5)	5/5	Azienda
12	Sangue Intero (6)	Emosiero (6)	5/6	Azienda
16	Emosiero (8)	Muscolo (8)	8/8	Mattatoio
14	Emosiero (7)	Emosiero (7)	6/7	Azienda
16	Sangue Intero (8)	Muscolo (8)	6/8	Mattatoio
18	Emosiero (9)	Emosiero (9)	9/9	Azienda
12	Sangue Intero (6)	Emosiero (6)	5/6	Azienda

Tabella 21. Rappresentazione schematica dei match riscontrati per i profili genetici analizzati. Il match 6/8 indica il ritrovamento di due campioni di non identità genetica, dove ciascuno di essi è da intendere come coppia di confronto.

7. DISCUSSIONE

Le frodi alimentari rappresentano oggi uno dei maggiori problemi di natura socio-economica e religiosa in quanto determinanti oltre che di un danno diretto al consumatore anche di ripercussioni economiche trasversali verso la categoria di prodotto oggetto della frode. L'aumento del consumo di prodotti di origine animale ha di fatto invertito una tendenza storica al consumo di prodotti farinacei (83) e, di pari passo, condotto ad una sempre maggiore diffusione delle pratiche illegali concernenti, tra le altre, la sostituzione di specie. A seguito infatti dei recenti scandali alimentari, tra tutti la diffusione in Europa di prodotti alimentari adulterati con carne di cavallo, i consumatori hanno manifestato un forte effetto di sfiducia nei confronti dei produttori del settore la quale ha di fatto rappresentato la spinta verso l'adozione di elevati standard di sicurezza per la prevenzione e la protezione della salute pubblica intesi come strumento di trasparenza e legalità. La stesura di questo lavoro ha avuto come obiettivi la validazione e l'implementazione di quelle metodiche molecolari oggi considerate il gold standard nel panorama della caratterizzazione genetica di specie. Precisamente, a partire da un pannello di matrici alimentari certificate, sono state eseguite le prove di caratterizzazione molecolare al fine di indagare e validare l'applicabilità dei metodi scelti, ovvero valutarne il loro possibile impiego nel settore della identificazione di specie animale per i prodotti commerciali a base di carne.

7.1 Estrazione del DNA

Un totale di 145 campioni, incluse le misture a differente percentuale create, sono stati impiegati per l'estrazione di DNA utilizzando due differenti kit commerciali, specifici per ciascuna matrice, e un metodo automatizzato per i soli campioni ematici costituiti da sangue intero. Le metodiche estrattive applicate si sono rilevate efficienti e, particolarmente per i campioni ematici, i metodi manuale e automatizzato posti a confronto non hanno determinato significative differenze del dato, fornendo pertanto valori sovrapponibili per entrambi i metodi di quantificazione impiegati. Prevedibilmente,

la concentrazione di acido nucleico determinata sui prodotti commerciali, rilevata sia spettrofotometricamente che tramite analisi di fluorescenza, ha evidenziato un ampio range di misure strettamente dipendenti dalla tipologia di matrice impiegata, in cui i valori maggiori sono stati registrati per tutti quei campioni non sottoposti a processi trasformativi o poco lavorati (es. carne macinata, hamburger). Alcune procedure sono infatti in grado di inficiare la resa quantitativa, ovvero la stabilità e la struttura dell'acido nucleico, quali trattamenti termici e variazioni di pH, i quali costituiscono parte integrante dei processi produttivi di numerosi prodotti commerciali e sono alla base di una serie di fenomeni degenerativi, primi su tutti la depurinazione e la frammentazione del DNA (84). In tali matrici trasformate esso risulta infatti molto degradato e, come osservato, presente in ridotte quantità in alcune tipologie di campione, il che determina una maggiore probabilità di insuccesso della metodica di amplificazione rispetto ad una matrice non lavorata o poco trattata. Inoltre, data la natura di tali prodotti, essi sono spesso costituiti da ingredienti, ovvero da sostanze organiche che rappresentano inibitori di reazione in grado di interferire con la stessa procedura di estrazione e inficiarne, se coestratti insieme all'acido nucleico, le reazioni immediatamente a valle (85). Pertanto l'estrazione del materiale genetico rappresenta il punto critico per la buona riuscita delle analisi, dove il DNA target potrebbe infatti rappresentare in taluni casi solo una piccola quota se comparato alla quantità totale estratta.

7.2 Real Time PCR

Le metodiche impiegate in questo lavoro, cosiddette PCR-based, rappresentano il gold standard del settore *food authentication* in quanto accurate e affidabili anche per ciò che concerne gli alimenti trasformati (86). Tra esse, la Real Time PCR è attualmente la tecnica maggiormente impiegata nella identificazione di specie dovuta prevalentemente alle sue caratteristiche di specificità e sensibilità. Tali proprietà però, benchè essenziali per la scelta dell'applicabilità o meno del metodo, sono strettamente correlate i) alla regione di DNA target scelta per l'analisi molecolare e ii) alla selettività delle coppie di oligo e sonde da impiegare per il saggio (87). Il nostro studio per le indagini di Real Time PCR ha previsto l'impiego della molecola di mtDNA a causa della sua elevata variabilità

intra e interspecifica, ovvero la sua presenza in multiple copie che di fatto i) aumenta la probabilità di rintracciare la specifica sequenza bersaglio anche se questa si trova a bassa concentrazione e ii) incrementa la probabilità che tale molecola sia integra e non interessata da degradazione anche a seguito dei processi trasformativi. Due differenti regioni target all'interno del genoma mitocondriale sono state quindi identificate e utilizzate ai nostri scopi, rispettivamente una porzione del citocromo b per gli studi di validazione condotti mediante metodica singleplex e una regione del mtDNA 12S scelta come sequenza bersaglio per l'implementazione di un saggio identificativo di tipo duplex (88). Le coppie di primers e sonde utilizzate per la validazione della metodica identificativa in singleplex, sono state ottenute da un precedente lavoro condotto sulla caratterizzazione di specie carnee (81). Secondo tale studio, le coppie primer/sonde, ciascuna selettiva per una diversa porzione del gene Cyt B, sono risultate altamente specifiche per ognuna delle specie indagate e in grado di identificare i bersagli ad elevata sensibilità, determinando per tale saggio valori di LOD e LOQ rispettivamente di 10^{-5} ng/µL (0.0001%) e 10^{-4} ng/µL (0.001%). La determinazione di livelli cosi sensibili ha messo in evidenza le differenze nei valori di detection e di quantificazione ritrovati nel nostro lavoro, risultate essere pari a circa 1 ordine logaritmico in meno per entrambi i parametri; fenomeni probabilmente ascrivibili alla i) variazione e adattamento dei protocolli di amplificazione utilizzati per l'esecuzione dei saggi, ii) alla differente composizione della miscela di reazione utilizzata nel nostro lavoro, nonchè iii) imputabili al fatto che le reazioni di amplificazione per lo studio di riferimento sono state condotte a partire da estratti di mtDNA, potrebbero complessivamente spiegare la minore sensibilità del saggio. In quest'ultimo caso, la miscela di reazione, non risentendo della controparte nucleare "inquinante", potrebbe lavorare a maggiore efficienza in quanto possibili fenomeni di competitività o di ingombro sterico in grado di inficiare l'azione delle coppie di oligo specie-specifiche durante la reazione di amplificazione sarebbero notevolmente ridotti. Ciononostante, il trasferimento metodologico al nostro esperimento ha dimostrato la versatilità e la robustezza tecnologica del saggio, nonchè la specificità di reazione delle coppie primer/sonde per ciascun target a partire, per il nostro lavoro, da estratti genomici delle matrici pure di bovino, ovino, suino ed equino. L'allestimento di curve di taratura per ciascuna specie in esame, costruite sui sei punti di concentrazione stabiliti (da 100

ng/µL a 0.001 ng/µL), ci ha permesso di stimare quei parameteri utili alla validazione del metodo quali sensibilità, riproducibilità e linearità, ovvero la specificità con la quale le coppie di oligo sono state in grado di rilevare il target, sia esso puro che all'interno delle miscele all'1%. Sulla base di ciò sono stati dunque determinati i valori di LOD e di LOQ del saggio singleplex, risultati lievemente differenti per ciascuna specie investigata. In particolare, il valore di LOD è stato fissato nel range dello standard 5 (10^{-3} ng/µL, 0.01%) per la specie Bovina ed Ovina e nel range dello standard 4 (10^{-2} ng/µL, 0.1%) per le specie Suina ed Equina, considerando come riferimento di tale misura la più piccola quantità di target per cui almeno il 90% dei replicati ha fornito esito positivo. L'approccio statistico ha invece adottato come misura di riferimento di LOD e LOQ quella concentrazione di standard al quale il valore di RSD calcolato è, rispettivamente, RSD<0.33 e RSD<0.25. Più in dettaglio, i valori di LOD oscillavano da 0.0008 ng/uL (0.8 pg) a 0.0013 ng/uL (1.3 pg) rispettivamente per la specie Ovina e Bovina; quelli di LOQ da 0.0009 ng/uL (0.9 pg) per la specie Ovina a 0.0028 ng/uL (2.8 pg) per quella Bovina; valori di LOD e LOQ intermedi sono stati registrati per le specie Suina ed Equina. Tali dati sono stati impiegati per studi di comparazione con le informazioni disponibili oggi in letteratura al fine di valutarne la loro affidabilità e la loro concordanza con i valori medi di riferimento. Valori di detection compresi nel range 0.01% - 5% sono stati registrati mediamente per gli studi di identificazione genetica in matrici alimentari (89) (90). Tra questi, Rea *et al.*, (2001) (91) hanno sviluppato un saggio duplex per l'identificazione dei target Bovino e Bufalo in prodotti caseari tipici, riportando per tale lavoro valori di detection al di sotto di 1 pg di DNA (1%). Altri studi hanno invece rivolto l'attenzione all'identificazione di specie per la più ampia categoria dei ruminanti, impiegando un pannello di oligo aventi come target corti elementi nucleari interspersi nel genoma (SINEs) (92). Gli studi di Lopez-Andreo *et al.*, (2006) (93) hanno descritto invece l'applicazione di saggi di identificazione di specie mediante analisi in SYBR green e successiva analisi delle curve di melting riportando valori di detection da 0,04 pg a 0.4 pg. Ancora, la messa a punto di numerosi saggi TaqMan progettati specificatamente su geni mitocondriali, ha determinato livelli medi di detection al di sotto dello 0.1%, oscillando da valori di circa 0,0001 ng/uL per matrici alimentari non processate (94) a livelli compresi tra 1 pg e 25 pg per lo studio di Chrisholm *et al.*, (2005) (95)

sull'identificazione specifica di specie Equina, nonché valori di detection di 0.01 ng/µL (0.1%) per la specie Suina impiegando come target molecolare una porzione del gene mitocondrale 12S (88). Per questo lavoro, complessivamente, sono state ottenute curve di amplificazione nel range del 100% sino allo 0.001%, equivalente rispettivamente a concentrazioni di 10 ng/µL e 10^{-4} ng/µL di DNA, sebbene per quest'ultimo valore dello standard 6 si è registrata una notevola perdità di riproducibilità del dato per tutte le specie investigate, nonchè di sensibilità del saggio, facendo registrare valori per tale parametro variabili dal 60% al 10% rispettivamente per la specie Bovina e per quella Equina. Questi dati evidenziano come chiaramente ogni saggio rappresenti una reazione unica e soggetta a variabili indipendenti, ovvero come la tipologia della coppia primer/sonda impiegata congiuntamente al tipo di DNA target scelto, nonchè alla sua qualità, possano giocare un ruolo cruciale nel buona riuscita del test. A sostegno di ciò, dai dati appare abbastanza chiaro come le curve di amplificazione registrate per la specie equina siano sempre posticipate di 1 o 2 Ct rispetto alle curve delle altre specie alla medesima concentrazione di target, ovvero caratterizzate da un basso livello di fluorescenza emessa. Una possibile spiegazione di tale fenomeno potrebbe derivare dal fatto che il maggiore contenuto in ferro di tale matrice, quasi doppio rispetto ai tagli bovini, ne condizioni a diverso livello l'efficienza di amplificazione, essendo il ferro un noto inibitore delle reazioni di PCR (85). Tale ragione potrebbe anche essere alla base della ridotta sensibilità di detection allo standard 6 rilevata per tale specie (1 campione su 10); nonostante infatti l'inibitore si trovi ad una concentrazione estremamente bassa all'interno di tale sospensione, questa, almeno in via teorica, avrebbe dovuto favorire l'amplificazione del target a causa della eguale riduzione dell'effetto inibitorio sulla reazione stessa. Per quanto concerne l'analisi delle curve di amplificazione per le misture carnee a differente rapporto percentuale (peso/peso) e create a partire delle specie pure, sono stati stimati quei valori di Ct equivalenti alla soglia dell 1%, calcolando al contempo la quantità di DNA target in essa contenuta per interpolazione con la retta degli standard. L'analisi dei dati ha mostrato curve di amplificazione per tutte le misture carnee testate sebbene per le specie 1% una bassa efficienza di amplificazione del target, ovvero uno shift in avanti dei valori di Ct sono stati registrati quando venivano confrontati con il medesimo punto di concentrazione della specifica retta standard. In tale fase si è inoltre evidenziato anche

una variabilità di risposta all'interno del medesimo gruppo di specie nonostante si trattasse della identica, presunta, percentuale di target all'interno della mistura. Questo fenomeno è stato particolarmente osservato per la specie Ovina 1%, dove probabilmente la presenza concomitante di un differente DNA a maggiore percentuale nella mistura ne influenza a diverso livello la sua amplificazione, determinando di fatto un andamento della curva diverso sebbene si tratti della medesima specie alla stessa percentuale. Analogamente, per tutte le specie Suino 1% si è registrato una decremento di efficienza di amplificazione e di livello di Ct registrato se comparato alla curva per tale specie in purezza. Contrariamente a quanto osservato sinora, si è invece registrato per tutte le prove eseguite, uno shift indietro nei valori di Ct per la specie Bovino 99%. Come conseguenza di ciò, lo sviluppo di un segnale di amplificazione già dai primi cicli di PCR ha determinato un innalzamento dei valori di fluorescenza la quale ha condotto ad una precoce saturazione del segnale dovuta verosimilmente alla elevata affinità di legame degli oligo per il target, ovvero a causa della più alta percentuale di matrice costituente la mistura. Come già accennato, l'esito di una reazione è infatti strettamente relato ad una serie di fattori, biologici innanzitutto, quali target scelto e affinità degli oligo per esso, al quale però devono essere affiancati tutte quelle variabili, ma non solo, derivanti dalla manipolazione dell'acido nucleico durante le fasi di sperimentazione e di lavoro. Queste devono tenere conto di una serie di condizioni quali cicli di congelamento/sconglemento del target e delle coppie di oligo/sonde, ovvero la possibile perdita di efficacia delle medesime per decadimento dell'attività di fluorescenza e in grado pertanto di condizionarne, seppure in maniera lieve, l'esito finale. Oltretutto, come discusso in precedenza, fattori aggiuntivi possono condizionare la piena uniformità del campione relativamente alla creazione delle misture carnee, quali pesata ed omogeneizzazione e in grado quindi di inficiare la relazione diretta tra il fattore percentuale, il ciclo soglia e la quantità di target. Tale fenomeno è infatti particolarmente apprezzabile quando si valutano i valori di Ct delle specie all'1% i quali risultano posticipati di qualche ciclo se confrontati con i relativi Ct nelle curve di amplificazione degli standard. Di contro, non sono state apprezzate significative differenze tra i valori di Ct delle misture e quelli dei pool di DNA. Ad ogni modo, per questi ultimi, una maggiore linearità dei dati è stata osservata nelle analisi delle curve di amplificazione le quali sono state per l'appunto

ottenute a partire dai singoli DNA delle matrici pure, sostenendo pertanto le ipotesi di variabilità sopra descritte.

7.3 Multiplex Real Time PCR

Uno degli obiettivi di questo lavoro è stato anche l'implementazione di un saggio di Multiplex PCR Real Time specificatamente progettato per l'identificazione di target della specie bovina, ovina e suina mediante l'impiego di sonde molecolari di tipo TaqMan MGB, sia sulle matrici commerciali che sulle specie pure e sulle misture. La disponibilità dei diversi mtDNA completi ha permesso di disegnare, a partire da uno studio di allineamento di sequenza, un set di primer e di sonde specifiche in grado di amplificare corti frammenti del mtDNA 12S in modo da applicare il saggio anche agli alimenti trasformati. L'assenza di prodotti secondari è stata valutata mediante analisi delle curve di melting le quali hanno evidenziato la specificità delle sonde progettate per i rispettivi target. A fronte di una elevata affinità della coppia primer/sonde, solo deboli curve di amplificazione al di sotto della threshold, non significative, sono state registrate alla concentrazione di 10^{-4} ng/µL oltre il 40° ciclo, mostrando quindi un comportamento cinetico più o meno analogo a quello per il saggio in singleplex. Tale limite di detection è probabilmente ascrivibile a una perdita di sensibilità delle sonde quando la diluizione limite del target è spinta a valori estremi, determinando pertanto, per tale metodica, valori di LOD di 10^{-3} ng/µL per tutte le specie testate (0.01%). L'applicazione del saggio alle misture alimentari a differente percentuale in peso di inquinante, ha mostrato, anche in tale caso, curve di amplificazione dotate di un andamento differente in termini di ciclo soglia e di fluorescenza emessa se comparate alle curve degli standard delle medesime specie. Tale fenomeno nel saggio duplex è molto probabilmente ascrivibile, i) come nel saggio singleplex, a fenomeni di ingombro sterico dovuti alla presenza concomitante di differenti target nella mistura, di cui uno ad una concentrazione circa 100 volte maggiore rispetto all'altro e ii) a fenomeni competitivi attribuibili alla presenza sia di una coppia di primer unica per entrambi i target da amplificare che di una doppia sonda di ibridazione. L'azione congiunta di questi fenomeni è pertanto responsabile del differente andamento delle curve di amplificazione per i differenti bersagli. Maggiore è infatti la differenza

nella concentrazione iniziale tra i due target, maggiori saranno gli effetti competitivi complessivi per il target a percentuale più bassa in quanto influenzato negativamente dalla amplificazione preferenziale del target ad alta concentrazione (96). Ciononostante, la possibilità di differenziare due diverse specie in un'unica reazione rappresenta sicuramente un vantaggio della metodica multiplex, ma al contempo le sue limitazioni ne restringono il campo di applicazione. Se da un lato è infatti possibile incrementare il numero di specie da testare simultaneamente, dall'altro questo approccio conduce ad una ben più laboriosa e spesso difficile fase di implementazione del sistema, derivante i) dall'incrementato segnale di background dovuto alla presenza di più sonde di ibridazione in reazione e ii) dai possibili fenomeni di formazione di strutture secondarie quali dimeri di primer e di primer/sonde che, sequestrandosi a vicenda, priverebbero la reazione di tali oligo inficiandone pertanto l'efficienza. Per tali motivi, sebbene il nostro saggio prevedesse l'impiego di due sonde di ibridazione per reazione, esso è stato comunque indagato per la verifica di possibili fenomeni di cross-reattività tra specie. A tale scopo, l'aggiunta in singolo delle sonde MGB ad un bersaglio non specifico e affine, ha messo in evidenza deboli fenomeni di cross-reazione all'approssimarsi del 40° ciclo della specie Ovina nei confronti delle specie Pollo e Tacchino. Occorre anche considerare infatti che, se da un lato l'impiego di una sonda di tipo MGB fornisce molti vantaggi, primo tra tutti la selettività del bersaglio molecolare nonostante la brevità della sua sequenza nucleotidica che garantisce al contempo un'alta Tm, essa potrebbe però determinare, a fronte di una regione di potenziale complementarietà di base, una parziale ibridazione aspecifica in grado comunque di fornire un segnale tardivo di positività quando posta in reazione con dei target simili filogeneticamente quali pollo e tacchino. Ad ogni modo, come per il saggio singleplex, anche la metodica duplex impiegata, sebbene sperimentale, si è rivelata una metodica sensibile e specifica, ovvero ci ha consentito di rilevare una curva di amplificazione unica per la specie all'1% all'interno delle misture e, di conseguenza, identificare mediante misura del Ct quella soglia minima prevista per l'assegnazione della positività.

7.4 Chip di Array e Real Time PCR per la matrici commerciali

La possibilità di identificare nelle misture alimentari livelli pari o superiori all'1% di inquinante, rappresenta sicuramente un requisito indispensabile nei saggi di caratterizzazione genetica, indice di affidabilità e garanzia del metodo, in grado di fornire certezza e valore alle analisi. Un utile approccio a questo scopo è sicuramente rappresentato dalla possibilità di rintracciare la quantità di sostanza inquinante nella miscela (87) o determinarne il suo livello in maniera indiretta mediante comparazione dei valori di Ct della specie inquinante con quelli di una miscela creata ad hoc a quella specifica percentuale da investigare (70). A tal proposito l'EURL ha emanato un piano coordinato di controllo volto a stabilire la prevalenza di pratiche fraudolente nella commercializzazione di determinati prodotti alimentari dettandone le procedure operative da seguire. Più in dettaglio, benché tale piano è stato emanato specificatamente per la rilevabilità di carne equina in un miscela carnea, esso è stato comunque trasferito in maniera sperimentale anche alle specie oggetto del nostro lavoro. Specificatamente, a seguito di richiesta di caratterizzazione di specie da parte degli organi competenti, tutti i campioni devono essere sottoposti preventivamente a test di screening iniziale volto a rilevare la presenza di matrici estranee nella carne ad un livello pari o superiore allo 0,5% (peso/peso) lasciando piena autonomia nella scelta del metodo da applicare. Solo successivamente, i campioni positivi al test di screening vanno sottoposti ad una prova di conferma semiquantitativa mediante PCR Real Time avente come oggetto il DNA mitocondriale e mirante a individuare la presenza dell'adulterante ad un livello pari o superiore all'1 %. Il metodo di conferma della contaminazione deve essere calibrato su un campione di controllo delle carni fresche, ovvero determinato mediante confronto del valore di Ct della sostanza adulterante nel campione incognito, con il Ct del campione di riferimento preparato e contenente l'1% del target oggetto del test. Se il valore del Ct del campione da saggiare è uguale o inferiore al Ct del campione di riferimento, allora la frazione di massa è superata e il campione sarà considerato positivo, utilizzando come valori di Cut-off per il Ct 1% uno scarto di ± 0.5 cicli. Una delle limitazioni del metodo di Real Time PCR, sia esso singleplex che multiplex, è dato dal fatto che il test è in grado di individuare solo quei target per la quale una coppia di oligo specie-specifica è stata disegnata. L'adulterazione di un prodotto alimentare può però coinvolegere un ampio

panorama di specie animali, anche non comuni, e non rilevabili mediante saggio di Real Time PCR se questo non è per esse specificatamente progettato. La possibilità pertanto di sfruttare un sistema di array sensibile e in grado di screenare simultaneamente i campioni in esame per un elevato numero di specie, ha sicuramente rappresentato un valido contributo per lo scopo di questo lavoro. In accordo con il protocollo operativo, un valore di Cut-off di 3500 è stato impostato per la lettura delle positività alla specie, equivalente ad un limite di detection compreso nel range 0.1 – 0.5 % e pertanto conforme alle direttive. Sui 25 campioni analizzati il 40% di essi ha evidenziato positività a una o più specie non riportate nelle specifiche del prodotto o dichiarate dal produttore, evidenziando dunque una non conformità di tali matrici. Come atteso, nessun campione è risultato positivo per il target Equino, mentre interessantemente si è appurato come 5 campioni erano addizionati dalla matrice pollo e 4 da quella suina. Solo un campione ha evidenziato positività alla matrice Tacchino, mentre deboli segnali di intensità al di sotto dei valori di cut-off stabiliti sono stati evidenziati per altre matrici alle specie Pollo e Tacchino. Tra questi, il prodotto Tortellini di carne ha evidenziato una debole positività alla matrice Pollo. Molto probabilmente, trattandosi di pasta fresca e avendo constatato la presenza dell'ingrediente uovo tra le specifiche del prodotto, il segnale rintracciato è stato attribuito ad un fenomeno di inquinamento occorso durante le metodiche di estrazione dell'acido nucleico. Le analisi di Real Time PCR immediatamente a valle sono state rivolte specificatamente verso quelle positività di specie rilevate nella fase di screening, nonchè indirizzate verso le specie per la quale i metodi di validazione interni sono stati applicati. Tali analisi si sono pertanto concentrate su 6 campioni in cui la matrice adulterante era rappresentata esclusivamente dalla specie suina o bovina e per esse sono stati verificati i valori di Ct del target inquinante alla soglia 1% impiegando entrambe le metodiche singleplex e duplex di Real Time PCR. L'analisi delle curve di amplificazione ha confermato la presenza delle sostanze adulteranti rilevate nella fase di screening. L'intensità delle curve di amplificazione, già dai primi cicli di reazione, ha mostrato forti segnali di positività per le sostanze inquinanti evidenziando valori di Ct di poco dissimili o intermedi se comparati alle rispettive curve dell'ingrediente principale dichiarato. Tale rappresentazione riflette dunque l'entità della contaminazione nei prodotti analizzati, i quali hanno mostrato cicli soglia entro il valore di riferimento della mistura 1% specifica

per quella data specie. Solo per la matrice commerciale Salame di Suino, è stata osservata una debole positività alla sostanza adulterante prossima alla soglia dell'1%, comunque non oltre il valore di Ct di riferimento della mistura per la stessa specie e sufficiente pertanto ad evidenziare il superamento della frazione di massa e l'assegnazione della positività. Complessivamente, su 10 campioni ritrovati positivi per altre specie animali oltre quella dichiarata in etichetta o dal produttore, 8 di essi provenivano dal settore della vendita al dettaglio, quali piccoli negozi e macellerie locali, e i rimanenti da stabilimenti o aziende della grande distribuzione. Nonostante le contaminazioni Bovino in Suino non seguano prettamente una logica di natura economico-commerciale, l'adulterazione riscontrata in tal senso è molto probabile provenire da tessuti di scarto della specie a maggiore valore economico, quali grassi o collagene, concretizzando comunque un comportamento illecito da parte del produttore. Appare dunque evidente come le maggiori adulterazioni riguardino quei prodotti commerciali distribuiti dai piccoli produttori locali, ma non solo, in cui la manipolazione è messa in atto probabilmente, oltre che per motivazioni economiche, anche dalla mancanza di informazioni relative alla separazione dei processi produttivi. Determinare infatti se si tratti di una contaminazione accidentale o di una miscelazione fraudolenta rappresenta sicuramente il punto cruciale del sistema di monitoraggio. Basti pensare all'utilizzo delle medesime attrezzature, oltretutto non accuratamente ripulite (es. tritacarne), durante la produzione di prodotti alimentari differenti che finiscono comunque per adulterare l'alimento e concretizzare di fatto l'illecito anche se talvolta in maniera del tutto colposa. Sebbene la possibilità di rilevare anche soglie minori del valore stabilito 1% rappresenti un indice di sensibilità della metodica, nella pratica quotidiana questo potrebbe non trovare concreta applicazione. In tutti quei casi infatti in cui concentrazioni molto basse di target adulterante sono rinvenute nelle matrici alimentari, determinare infatti se si tratti di una manipolazione intenzionale o meno può talvolta rappresentare un ostacolo alla corretta interpretazione del fatto. Il ritrovamento di limiti inferiori o uguali all'1% nel prodotto analizzato non garantisce che l'adulterazione da parte del produttore sia voluta, sebbene a causa di motivi religiosi, essa non è assolutamente accettata. Piuttosto, la presenza di tali sostanze inquinanti il prodotto commerciale, ritrovate in percentuali sotto la soglia,

potrebbero essere anche spesso attribuite a contaminazioni risultanti da precedenti processi lavorativi, cosiddette contaminazioni carryover (97).

7.5 Marcatori STR

La garanzia di una corretta identificazione dei costituenti un prodotto alimentare rappresenta l'elemento di base in grado di individuare e limitare le frodi del settore. La possibilità infatti di tracciare a ritroso un prodotto alimentare in merito alla sua provenienza è strettamente correlata all'adozione di un adeguato sistema di identificazione animale. A tal proposito si è sviluppato un crescente interesse in ambito di sanità animale di quelle metodologie applicate al campo della genotracciabilità individuale per la determinazione del profilo genetico di un singolo individuo. Conoscere infatti il profilo genetico di un singolo animale, relativamente ad un certo polimorfismo, consente di assicurare la completa tracciabilità delle carni lungo l'intera filiera, dalla produzione primaria alla vendita al consumatore, anche con particolare riferimento ai prodotti che vantano specifiche qualità alimentari (98). Per condurre indagini di tale tipo occorre che la tecnica applicata unisca sensibilità e alto potere discriminante, in modo da permettere di utilizzarla anche su quantità minime di campione e di identificare un individuo in maniera univoca e con un basso margine di errore (99) (100). Il metodo di tracciabilità genetica impiegato in questo lavoro ha riguardato lo studio di un numero complessivo di 112 campioni di bovino provenienti da 8 differenti aziende del territorio, afferenti al laboratorio IZS per lo studio di identità genetica tra capi. Dall'analisi degli elettroferogrammi sono emerse delle irregolarità coinvolgenti 4 delle 8 aziende indagate. Particolarmente, i dati hanno evidenziato delle non identità genetiche relativamente a i) 2 campioni di tessuto muscolare prelevati in fase post mortem al mattatoio di una azienda del Catanese di cui le matrici di riferimento ematiche erano già disponibili presso i laboratori IZS e ii) 3 campioni ematici di altrettante aziende del territorio (2 del Ragusano e 1 del Palermitano), prelevati a differenti intervalli di tempo e per i quali, per una di esse, le matrici di riferimento ematiche erano anche in questo caso già disponibili presso i laboratori IZS a seguito di precedenti attività di controllo sul territorio per il piano di monitoraggio della tubercolosi e brucellosi bovina. Il dato di non sovrapponibilità

genetica è stato rappresentato dalla mancata corrispondenza con la matrice di riferimento oggetto del confronto diretto a fronte invece di una piena corrispondenza, ad eccezione delle matrici muscolari, con il profilo genetico di più capi all'interno del medesimo gruppo di campioni analizzati. La constatazione quindi di un identico profilo genetico condiviso da più di due capi, ha rappresentato la difformità maggiormente riscontrata nelle analisi di genotracciabilità, in cui è facile intuire come l'atto illegale venga messo in opera effettuando diversi prelievi ematici da un animale cosiddetto donatore e concretamente catalogando il prelievo come appartenente ad un capo differente. Questo tipo di pratica illegale trova spesso applicazione anche nell'ambito dei controlli sanitari per la verifica dello stato di salute dei capi bovini, in cui animali affetti da patologie infettive, quali brucellosi o tubercolosi, sono falsamente diagnosticati come negativi per effetto del contributo di un donatore indenne.

Tra le non identità riscontrate, particolarmente, uno profilo di non sovrapponibilità genetica era dovuto ad una sola difformità allelica presente ad un solo locus a fronte degli 11 analizzati. Questo tipo di reperto trova spesso riscontro nel panorama della genotracciabilità nelle aziende del nostro territorio in quanto profili allelici simili tra animali non relati sono dovuti i) ad eccessivi programmi di inbreeding che portano ad un conseguente eccesso di omozigoti nella popolazione con innalzamento dei livelli di consanguineità e ii) alla differente genetica della nostra popolazione in quanto frutto di un isolamento geografico. Ciò comporta la diffusione sul territorio di genetiche tra loro molto simili cosicché, di fatto, gli animali condividono un certo livello di parentela. Si rende necessario dunque, ai fini della validazione del metodo applicato, il confronto ponderato dei differenti profili allelici in funzione della rappresentatività di quell'allele nella popolazione in esame. L'attribuzione di una identità genetica deve infatti essere sempre espressa in termini di probabilità percentuale la quale ci fornisce una stima della frequenza con la quale un profilo ricorre all'interno della popolazione (101). Per il pannello impiegato e costituito da 11 marcatori STR raccomandati dall'ISAG, tale parametro ha sostenuto l'attendibilità del saggio. I dati ottenuti hanno pertanto dimostrato che l'utilizzo di metodiche biomolecolari si prestano ad essere uno strumento di controllo affidabile per la verifica del sistema di tracciabilità in ogni fase della filiera produttiva. Lo strumento della genotracciabilità, adeguatamente impiegato, può dunque conferire

ampio vantaggio ai fini dell'individuazione degli animali per gli scopi già indicati e, più in generale, per il controllo delle problematiche di sanità pubblica veterinaria nel settore bovino.

8. CONCLUSIONI

Con l'incremento del consumo di prodotti alimentari a base di carne e la presa di consapevolezza del consumatore riguardo la composizione degli stessi, è divenuta oggi essenziale la verifica accurata degli ingredienti dichiarati quale sistema di monitoraggio di una produzione alimentare trasparente ed esente da frodi. Tale situazione ha di fatto portato nel corso dell'ultimo decennio il settore del *food authentication* ad occupare un ruolo centrale nel panorama agro-alimentare allo scopo di garantire la fedeltà di un prodotto e l'applicazione delle misure correttive in grado di soddisfare tali requisiti. Le tecniche basate sul DNA hanno oggi quasi del tutto rimpiazzato quelle fondate sull'analisi della componente proteica a causa degli indubbi vantaggi derivanti dall'impiego dell'acido nucleico come target molecolare, quali termostabilità e abbondanza percentuale, soprattutto per quanto concerne la componente mitocondriale. La metodica analitica applicata per l'identificazione di specie negli alimenti di origine animale ha previsto l'impiego della tecnica di Real Time PCR su specifici target di mtDNA, tanto come saggio singleplex che come duplex, ed entrambe affidate all'impiego di sonde TaqMan fluorescenti. Il metodo impiegato si è rivelato in grado di evidenziare il target molecolare entro un determinato intervallo di detection specie-specifico e quantificarlo con un certo grado di confidenza anche per quanto concerne gli alimenti trasformati, di complessa composizione e trattati in genere in maniera estrema a causa del loro processo lavorativo. Le sonde TaqMan impiegate in questo studio, hanno delineato un alto potenziale di applicazione e un buon grado di affinità per il target, rendendole pertanto applicabili in tutte quelle analisi routinarie (specialmente quelle non MGB) per la caratterizzazione genetica di specie bovino, ovino, suino ed equino in matrici alimentari. Mediante ottimizzazione del saggio per ciascuna specie si potrà fornire oltretutto un contributo nella distinzione di specie filogeneticamente relate nonchè estendere la metodica ad altre specie, le quali, hanno dimostrato occupare un ruolo di rilievo nelle pratiche fraudolente di sostituzione di specie. Tale reperto mostra infatti come a seguito del recente scandalo della carne equina, nessun campione è risultato inquinato da tale specie, dimostrando che l'attenzione del frodatore si è semplicemente

spostata verso altre specie non considerate precedentemente per l'adulterazione o comunque passate inosservate perché non specificatamente ricercate o perché non dannose per la salute umana. Tra queste, il consumo di carni appartenenti alle famiglie dei Canidi o Felidi, ampiamente diffuso in alcune regioni asiatiche, probabilmente potrebbe in un prossimo futuro rappresentare la nuova frontiera delle matrici adulteranti, evidenziando come oggi l'ampia disponibilità di prodotti destinati al consumo umano potrebbe di fatto aprire le porte ad ampie chance di falsificazione, anche grazie all'ormai incalzante globalizzazione dei mercati extra UE. La possibilità di rintracciare più target in unica reazione di amplificazione rappresenta ad oggi la sfida tecnologica maggiore per il settore alimentare e forense. Sebbene l'impiego di chip di array specifici per le matrici carnee abbiano fornito un valido contributo al nostro scopo in termini di screening, essi sono oggi in grado di soddisfare solo parzialmente questa richiesta, in quanto presentano comunque piccoli svantaggi relati alla metodica in sé e inerenti, tra gli altri, la minore capacità di quantizzazione a causa degli effetti di saturazione e i parziali fenomeni di cross reazione che possono verificarsi tra specie molto vicine (*Bos taurus* e *Bubalus bubalis*). L'implementazione del sistema multiplex ha di fatto superato tali ostacoli, in quanto ha fornito la possibilità di identificare due specie simultaneamente in un unico saggio di reazione rendendo tale metodica meno soggetta ad errori e consentendo al contempo un risparmio dei tempi di esecuzione pur non compremettendo l'accuratezza del dato. L'applicabilità routinaria come test diagnostico potrebbe presentare ancora qualche ostacolo relativamente all'elevato costo del saggio dovuto all'impiego di sonde di tipo MGB. Ulteriori sviluppi in tal senso prevederanno pertanto la possibilità di impiego del saggio dulplex mediante sonde TaqMan non MGB, opportunamente progettate, di modo da rendere il sistema applicabile anche su base routinaria all'interrno del laboratorio. La metodologia multiplex PCR è stata inoltre estesa al settore della tracciabilità genetica per l'accertamento di corrispondenza tra capi bovini in allevamento. L'identificazione dei capi bovini è oggi realizzata mediante l'utilizzo di sistemi di riconoscimento che garantiscono e attestano la veridicità delle informazioni registrate. Poichè tali flussi informativi possono essere soggetti a modifiche volontarie o errori, al fine di fornire una visione d'insieme del complesso panorama della sicurezza alimentare, è risultato utile in questo lavoro integrare le metodiche di identificazione di specie con

uno strumento di indagine genetica che potesse accertare con sicurezza l'origine delle carni relato anche al loro stato di salute. Come gia discusso, tale metodica è oggi sfruttata nel settore del controllo sanitario in materia di tubercolosi e brucellosi bovina in quanto strumento di verifica di identità per quegli animali classificati erroneamente negativi ai test come conseguenza del contributo di un donatore indenne. La doppia valenza di tale sistema di indagine lo rende pertanto idoneo come strumento di verifica delle pratiche illegali, tanto in azienda che in allevamento, nonchè come mezzo per la tutela e la prevenzione della salute pubblica da un rischio concreto dato dalla possibilità di immissione in commercio di prodotti derivanti da capi infetti. Le applicazioni di tale tecnica riguarderanno la sua estensione pratica nel collegare in maniera diretta le informazioni di un prodotto con l'animale da cui esso proviene, soprattutto per quanto concerne le piccole realtà commerciali di vendita al dettaglio dove spesso le etichette mancano del collegamento diretto. L'impiego pertanto delle metodiche genetiche identificative rappresentano oggi quel sistema in grado di dare veridicità assoluta alle informazioni che accompagnano quel dato animale, integrando i sistemi ordinari di tracciabilità.

In conclusione, in questo lavoro abbiamo dimostrato come i saggi di screening in microarray e di conferma, applicati alle matrici alimentari, abbiano fornito un valido contributo allo sviluppo dei metodi identificativi per la caratterizzazione genetica di specie. I risultati di tale lavoro sono forniti dalla ottimizzazione e validazione della metodica di singleplex e dalla implementazione di un sistema duplex, entrambi in termini di detection e quantificazione per la determinazione di specie nelle misture alimentari. L'applicazione delle metodiche di tracciabilità sono state invece in grado di determinare la corrispondenza genetica tra capi, fornendo uno strumento in grado di agire a monte e prevenire l'atto illecito di immissione nel mercato di prodotti non conformi. L'analisi di 25 prodotti commerciali per la verifica genetica di specie animale ha riportato in alcuni casi la presenza di sostanze adulteranti oltre la soglia definita dell'1%. Ne consegue che le metodologie di indagine applicate in questo studio hanno complessivamente rappresentato un valido contributo nella pratica veterinaria e si sono rivelate di grande utilità nel settore della sicurezza alimentare in materia di sanità pubblica.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Libro bianco sulla sicurezza alimentare, Doc COM (1999) 719 def.

2. 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.

3. Regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 in materia di igiene dei prodotti alimentari.

4. Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

5. Regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

6. Decreto del Presidente della Repubblica n. 187 del 09/02/2001 - Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari, a norma dellàrticolo 50 della legge 22 febbraio 1994, n. 146 (G.U. n. 117 del 22/05/2001).

7. Decreto Legislativo n. 109 del 27/01/1992 - Attuazione delle direttive 89/395/CEE e 89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari (S.O.G.U. n. 39 del 17/02/1992); modificato dai Decreti del Presidente del Consiglio dei Ministri n. 175 del 06/02/1996 (G.U. n. 76 del 30/03/1996) e n. 311 del 28/07/1998 (G.U. n. 218 del 18/09/1997), e dai Decreti Legislativi n. 68 del 25/02/2000 (G.U. n. 72 del 27/03/2000) e n. 181 del 23/06/2003 (G.U. n. 167 del 21/07/2003).

8. Decreto Legislativo n. 181 del 23 giugno 2003 - Attuazione della direttiva 2000/13/CE concernente l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonchè la relativa pubblicità (G.U. n. 167 del 21 luglio 2003).

9. Regolamento UE n. 1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE)

n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione.

10. Decreto Legislativo n. 114 del 8 febbraio 2006 - Attuazione delle direttive 2003/89/CE, 2004/77/CE e 2005/63/CE in materia di indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari (G.U. n. 69 del 23 marzo 2006).

11. 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.

12. Regolamento (CE) n. 1825/2000 della Commissione del 25 agosto 2000 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1760/2000 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carni bovine.

13. Golan E., Krissof B., Kuchler F., Nelson K., Price G. (2004). *Traceability in the US food supply: economic theory and industry studies*. Agricultural Economic report no. AER830 (pp. 56). Eshington, DC: Economic research service of the United States department of Agriculture.

14. Spink J. e Moyer D.C. (2011). *Defining the Public Health Threat of Food Fraud*. Journal of Food Science 76(9): 157-163.

15. Semeraro A.M. (2011). *Frodi alimentari: aspetti tecnici e giuridici*. Rassegna di Diritto, Legislazione e Medicina Legale Veterinaria, 10(2).

16. Nebbia G. (1962). *Aspetti storici del problema del controllo della qualità delle merci nel mondo antico e nel Medioevo*. Quaderni di Merceologia: 327-380.

17. Sorcinelli P. (1999). *Gli italiani e il cibo: dalla polenta ai cracker*. Ed. Mondadori, Milano.

18. Lo Russo S. e Porcu M. (1989). *Le frodi alimentari in Italia: prevenzione,* legislazione, repressione, statistiche. Ed. Chiriotti, Pinerolo.

19. Malandra R. e Renon P. (1998). Le principali frodi nei prodotti della pesca. V.L.U.,

Libreria Universitaria Multimediale, Milano.

20. Rehbein H. (1990). *Electrophoretic tecniques for species identification of fishery products*. Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung 191, 1-10.

21. Carrera E., Garcia T., Cespedes A., Gonzalez I., Sanz B., Hernandez P.E., Martin R. (1997). *Immunostick colorimetric ELISA assay for the identification of smoked salmon (Salmo salar), trout (Oncorhynchus mykiss) and bream (Brama raii).* Journal of the Science of Food and Agriculture 74, 547-550.

22. Meyer R. e Candrian U. (1996). *PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components.* LWT - Food Science and Technology 29, (1-2): 1-9.

23. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Erlich H.A., Arnheim N. (1985). *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science 230, (4732): 1350-1354.

24. Shioda H., Satoh K., Nagai F., OkuboT., Seto T., HamanoT., Kamimura H., Kano I. (2003). *Identification of Aloe species by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis* (in Japanese). Shokuhin Eiseigaku Zasshi 44, 203-207.

25. Gupta A.K., Boekhout T., Theelen B., Summerbell R., Batra R. (2004). *Identification and typing of Malassezia species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of ribosomal DNA*. Journal of Clinical Microbiology 42, 4253-4260.

26. Hellberg R.S.R. e Morrissey M.T. (2011). *Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market*. Journal of the Association for Laboratory Automation 16, 308-321.

27. Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003). *Biological identifications through DNA barcodes*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270, (1512): 313-321.

28. Ficetola G.F., Coissac E., Zundel S., Riaz T., Shehzad W., Bessière J., Taberlet P., Pompanon F. (2010). *An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes.* BMC Genomics 11, 434.

29. Hebert P.D., Stoeckle M.Y., Zemlak T.S., Francis C.M (2004). *Identification of Birds through DNA Barcodes*. PLoS Biology 2,(10): e312.

30. Meyer C.P. e Paulay G. (2005). *DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling.* PLoS Biology 3,(12): e422.

31. Wiemers M. e Fiedler K. *Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae).* Frontiers in Zoology 4, 8.

32. Pesole G., Gissi C., De Chirico A., Saccone C. (1999). *Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes.* Journal of Molecular Evolution 48,(4): 427-434.

33. Brown W.M., George M. Jr., Wilson A.C. (1979). *Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.* PNAS 76, (4): 1967-1971.

34. Salgado J., Honorato B., Garcia-Foncillas J. (2008). *Review: Mitochondrial Defects in Breast Cancer.* Oncology 2, 199-207.

35. Haider N., Nabulsi I., Al-Safadi B. (2012). *Identification of meat species by PCR-RFLP of the mitochondrial COI gene.* Meat Science 90, 490-493.

36. Bravi C.M., Lirón J.P., Mirol P.M., Ripoli M.V., Peral-García P., Giovambattista G. (2004). *A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene.* Legal Medicine (Tokyo, Japan) 6, 246-251.

37. Mitani T., AkaneA., Tokiyasu T.,Yoshimura S., Okii Y.,Yoshida M. (2009). *Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA gene.* Legal Medicine (Tokyo, Japan) 11 Suppl 1: S449-450.

38. Saccone C., De Giorgi C., Gissi C., Pesole G., Reyes A. (1999). *Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system.* Gene 238, (1):195-209.

39. Wang Q., Zhang X., Zhang H.Y., Zhang J., Chen G-Q., Zhao D-H., Ma H-P., Liao W-J. (2010). *Identification of 12 animal species meat by T-RFLP on the 12S rRNA gene.* Meat Science 85, 265-269.

40. Verma S.K. e Singh L. (2003). *Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application.* Molecolar Ecology Resources 3, (1): 28-31.

41. Dawnay N., Ogden R., McEwing R., Carvalho G.R., Thorpe R.S. (2007). *Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification.* Forensic Science International 173, 1-6.

42. Foran D.R. (2006). *Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: an experimental approach.* Journal of Forensic Science 5, 766-770.

43. Ramakers C., Ruijter J., Deprez R. e Moorman A. (2003). *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data*. Neuroscience Letters 339, (1): 62-66.

44. Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. (1997). *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.* Biotechniques 22, 130-138.

45. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Mickey Williams P.M. (1996). *Real Time Quantitative PCR.* Genome Research 6, (10): 986-994.

46. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N. (2006). *The real-time polymerase chain reaction.* Molecular Aspects of Medicine 27, 95-125.

47. Saunders N. (2009). *An introduction to Real Time PCR.* In: Real-Time PCR: Current Technology and Applications. Edited by: Logan J., Edwards K., Saunders N. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

48. Logan J.M.J., Edwards K.J. (2009*). An Overview of Real-Time PCR Platforms.* Saunders N. (2009). In: Real-Time PCR: Current Technology and Applications. Edited by: Logan J., Edwards K., Saunders N. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

49. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993). *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.* Biotechnology 11, (9): 1026-1030.

50. Morrison T.B., Weis J.J., Wittwer C.T. (1998). *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*. Biotechniques 24, 954-962.

51. Schmittgen T.D., Zakrajsek B.A., Mills A.G., Gorn V., Singer M.J., Reed M.W. (2000). *Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods.* Analytical Biochemistry 285, (2): 194-204.

52. Cardullo R.A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P.C., Wolf D.E. (1988). *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer*. Proceedings of the National Academy of Sciences 85, (23): 8790-8794.

53. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996). *Real time quantitative PCR.* Genome Research 6, 986-994.

54. Lunge V.R., Miller B.J., Livak K.J., Batt C.A. (2002). *Factors affecting the*

performance of 5' nuclease PCR assays for Listeria monocytogenes detection. Journal of Microbiology Methods 51, (3): 361-368.

55. Tombline G., Bellizzi D., Sgaramella V. (1996). *Heterogeneity of primer extension products in asymmetric PCR is due both to cleavage by a structure-specific exo/endonuclease activity of DNA polymerases and to premature stops.* Proceedings of the National Academy of Sciences 93, (7): 2724-2728.

56. Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H. (1997). *Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol*. Biotechniques 23, (3): 504-511.

57. Köppel R., Ruf J., Zimmerli F., Breitenmoser A. (2008). *Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey*. European Food Research and Technology 227, (4): 1199-1203.

58. Iwobi A., Sebah D., Kraemer I., Losher C., Fischer G., Busch U., Huber I. (2015). *A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat.* Food Chemistry 169, 305-313.

59. Edwards K.J. (2004). *Performing Real Time PCR.* In: Real-Time PCR: An Essential Guide. Edited by: Logan J., Edwards K., Saunders N. Caister Academic Press, Norfolk, UK.

60. McPherson M.J. e Moller S.G. (2006). *PCR - Second Edition.* Taylor & Francis Group, Oxford, UK.

61. D'Aquila R.T., Bechtel L.J., Videler J.A., Eron J.J., Gorczyca P., Kaplan J.C. (1991). *Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating.* Nucleic Acids Research 19, (13): 3749.

62. Simonsson T. (2001). *G-Quadruplex DNA structures – variations on a theme*. Journal of Biological Chemistry 382, 621.

63. Oste C. (1988). *Polymerase chain reaction*. BioTechniques 6, 162-167.

64. Valentini O. e Milanesi B. (2005). *Analisi quantitativa in biologia molecolare*. RIMeL – IJLaM 1, (3): 170-182.

65. Richards G.P. (1999). *Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods*. Journal of Food Protection 62, 691-697.

66. Klančnik A., Kovač M., Toplak N., Piskernik S., Jeršek B. (2012). *PCR in food analysis*, 195-220. In book: Polymerase chain reaction. Editors: Patricia Hernàndez-Rodriguèz, Arlen Patricia Ramirez Gomez.

67. Weyant R.S., Edmonds P., Swaminathan B. (1990). *Effect of ionic and non-ionic detergents on the Taq polymerase.* Biotechniques 9, 308-309.

68. *Real-time PCR: understanding Ct*. Application Note. Applied Biosystems, Thermofisher.

69. *Real-time PCR Handbook*. Life Technologies, Thermofisher.

70. Addendum to the EURL-AP protocol: Cut-off to check the 1% level threshold of horse meat in another meat.

71. Marmur J. e Doty P. (1961). *Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. Journal of Molecular Biology* 3, 585-594.

72. Sundberg S.A., Chow A., Nikiforov T., Wada G. (2001). *Microchip-based systems for biomedical and pharmaceutical analysis.* European Journal of Pharmaceutical Sciences 14, (1): 1-12.

73. Bains W., Smith G.C. (1988). *A novel method for nucleic acid sequence determination.* Journal of Theoretical Biology 135, 303-307.

74. Trevino V., Falciani F., Barrera-Saldaña H.A. (2007). *DNA Microarrays: a Powerful Genomic Tool for Biomedical and Clinical Research*. Molecular Medicine 13, (9-10): 527-541.

75. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985). *Individual-specific 'fingerprints' of human DNA.* Nature 316, 76-79.

76. Levinson G. e Gutman G.A. (1987). *Slippedstrand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution*. Molecular and Biology Evolution 4, 203-221.

77. Shackell G.H., Mathias H.C., Cave V.M., Dodds K.G. (2005). *Evaluation of microsatellites as a potential tool for product tracing of ground beef mixtures.* Meat Science 70, (2): 337-345.

78. Lahiff S., Glennon M, Lyng J., Smith T., Shilton N., Maher M. (2002). *Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples*. Journal of Food Protection 65, 1158-1165.

79. Use of the EURL-AP reference material to check the 1% level threshold of horse

meat in beef.

80. Janczewski D.N., Modi W.S., Stephens J.C., ÒBrien S.J. (1995). *Molecular evolution of mitochondrial 12S RNA and cytochrome b sequences in the pantherine lineage of Felidae*. Molecular Biology Evolution 12, (4): 690-707.

81. Tanabe S., Hase M., Yano T., Sato M., Fujimura T., Akiyama H. (2007). *A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton, and Horseflesh in Foods.* Bioscience Biotechnology Biochemistry 71, 70683, 1-5.

82. Trapman S., Burns M., Broll H., Macarthur R., Wood R., Zel J. (2009). *Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories*. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements.

83. Ali M.E., Kashif M., Uddin K., Hashim U., Mustafa S., Che Man Y.B. (2012). *Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of halal forensics*. Food Analytical Methods 5, (5): 935-955.

84. Bauer T., Weller P., Hammes W.P., Hertel C. (2003). *The effect of processing parameters on DNA degradation in food*. European Food Research and Technology 217, 338-343.

85. Demeke T. & Ronald Jenkins G.R. (2010). *Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits.* Analytical and Bioanalytical Chemistry 396, 1977-1990.

86. Ballin N.Z., Vogensen F.K., Karlsson A.H. (2009). *Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration?* Meat Science 83, (2): 165-174.

87. Bottero M.T. & Dalmasso A. (2011). *Animal species identification in food products: evolution of biomolecular methods*. The Veterinary Journal 190, (1): 34-38.

88. Rodriguez M.A., Garcia T., Gonzalez I., Hernandez P.E., Martın R. (2005). *TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures.* Meat Science 70, 113-120.

89. Calvo J. H., Osta R., Zaragoza P. (2002). *Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pate.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, (19): 5265-5267.

90. Meyer R., Canadrian U., Luethy J. (1994). *Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction.* Journal of AOAC International 77, (3): 617-622.

91. Rea S., Chikuni K., Branciari R., Sangamayya S. R., Ranucci D., Avellini P. (2001). *Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese*. Journal of Dairy Research 68, 689-698.

92. Mendoza-Romero L., Verkaar E. L., Savelkoul P. H., Catsburg A., Aarts H. J., Buntjer J. B., Lenstra J. A. (2004). *Real-time PCR detection of ruminant DNA*. Journal of Food Protection 67, (3): 550-554.

93. Lopez-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 of Agriculture and Food Chemistry 54, (21): 7973-7978.

94. 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.

95. Chisholm J., Conyers C., Booth C., Lawley W., Hird H. (2005). *The detection of horse and donkey using real-time PCR*. Meat Science 70, (4): 727-732.

96. Zha D.M., Xing X.M., Yang F.H. (2011). *Rapid identification of deer products by multiplex PCR assay*. Food Chemistry 129, (4): 1904-1908.

97. Bourguiba-Hachemiand S. & Dahmani Fathallah M. (2016). *DNA testing of meat foods raises issues beyond adulteration*. Sky Journal of Food Science 5, (1): 1-7.

98. Arana A., Soret B., Lasa I., Alfonso L. (2002). *Meat traceability using DNA markers: Application to the beef industry*. Meat Science 61, 367-373.

99. Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L.P., Bouvet J. (1996). *Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR.* Nucleic Acids Research 24, 3189-3194.

100. Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M., Shalom A., et al. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. Nature Genetics 6, 227-235.

101. Cosenza M., Reale S., Lupo T., Vitale F., Caracappa S. (2015). *Allele frequencies of microsatellite loci for genetic characterization of a Sicilian bovine population.* Genetics and Molecular Research 14, (1): 691-699.