

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biomedicina comparata e alimentazione (BCA)

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

CICLO: XXVI

**SVILUPPO, MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DI METODI MOLECOLARI
PER L'INDAGINE DELLE FRODI NEL SETTORE ITTICO**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Supervisore :Dott. Luca Fasolato

Dottorando : Michele Civettini

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1. CLASSIFICAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI	11
1.2. L'ETICHETTATURA DEI PRODOTTI ITTICI	11
1.3. LE FRODI ALIMENTARI	12
1.4. FRODE DI SOSTITUZIONE NEI PRODOTTI DELLA PESCA	15
1.5. METODI IDENTIFICAZIONE DI SPECIE	15
1.5.1. Metodi non basati sull'utilizzo della PCR	16
1.5.1.1. <i>Isoelettrofocalizzazione (IsoElectrofocusing-IEF)</i>	16
1.5.1.2. <i>Elettroforesi capillare (Capillary Electrophoresis-CE)</i>	16
1.5.1.3. <i>HPLC (High Performance Liquid Chromatography)</i>	16
1.5.1.4. <i>Saggio ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay)</i>	17
1.5.2. Metodi basati sull'utilizzo della PCR	17
1.5.2.1. <i>Disegno dei primer</i>	17
1.5.2.2. <i>PCR end-point</i>	20
1.5.2.3. <i>Barcoding</i>	23
1.5.2.4. <i>PCR Real-Time</i>	25
1.5.2.5. <i>High resolution Melt Analysis (HRMA)</i>	30
1.6. VALIDAZIONE DEI METODI DI PROVA	36
2. SCOPO	38
3. CASI DI STUDIO – Barcoding	40
3.1. INTRODUZIONE – barcoding applicato alle frodi nel settore ittico	40
3.2. MATERIALI E METODI – barcoding	41
3.3. MATERIALI E METODI – ittiobase	43
3.4. MATERIALI E METODI – attività di sorveglianza	46
3.5. RISULTATI E DISCUSSIONE	47
4. CASI DI STUDIO - PCR Real-Time	54
4.1. INTRODUZIONE – <i>Octopus vulgaris</i>	54
4.2. MATERIALI E METODI – PCR Real-time applicata a <i>Octopus vulgaris</i>	57
4.2.1. Raccolta dei campioni di riferimento	57
4.2.2. Identificazione molecolare	57

4.2.3.	Il caso di <i>Octopus membranaceus</i>	57
4.2.4.	Messa a punto della metodica molecolare di riconoscimento	59
4.2.5.	Preparazione del campione standard	61
4.2.6.	Raccolta campioni GDO	61
4.2.7.	Analisi statistiche dei dati	62
4.3.	RISULTATI	64
4.4.	DISCUSSIONE	82
5.	CASI DI STUDIO – HRMA applicata al genere <i>Thunnus</i>	85
5.1.	INTRODUZIONE – il genere <i>Thunnus</i>	85
5.2.	MATERIALI E METODI - HRMA applicata al genere <i>Thunnus</i>	86
5.2.1.	Disegno dei primer specifici	86
5.2.2.	Test <i>in vitro</i> dei primer	93
5.2.2.1.	<i>Quantificazione e normalizzazione del DNA</i>	93
5.2.2.2.	<i>Test delle temperature di annealing e clustering</i>	93
5.2.2.3.	<i>Test di specificità</i>	96
5.3.	RISULTATI	97
5.4.	DISCUSSIONE	108
6.	CONCLUSIONI	110
7.	BIBLIOGRAFIA	113
8.	ALLEGATI	121

RIASSUNTO

Il panorama ittico rappresenta un settore molto importante nel contesto produttivo alimentare, sia per l'aspetto economico sia per quello nutrizionale. Negli ultimi anni si osserva infatti un incremento dei consumi dovuto alla crescente offerta di nuove specie ittiche che si presentano sul mercato e alla continua innovazione nei settori della produzione e della distribuzione.

Il metodo del Barcoding, proposto in questo lavoro di Dottorato come *gold standard* di riferimento, è stato utilizzato per la costruzione di un database locale biologico e di sequenze, creando così uno strumento robusto e utile per qualunque laboratorio operante nell'ambito dell'identificazione di specie ittiche.

È stata inoltre testata la robustezza del database e la riproducibilità del metodo Barcoding mediante l'organizzazione di un ring trial.

Durante tutto il periodo di dottorato è stata svolta un'attività di sorveglianza sui mercati di tutto il territorio nazionale che ha permesso di mettere in luce una percentuale di frodi maggiore in alcuni gruppi di specie (molluschi cefalopodi, cernie e gadiformi), mentre una percentuale minore è stata riscontrata nei pesci piatti, i quali hanno però rappresentato la percentuale maggiore dei campioni raccolti.

Durante questa attività non è stato possibile valutare le frodi riguardanti i campioni appartenenti al genere *Thunnus*, in quanto facenti parte di gruppi geneticamente molto simili. È stato quindi condotto uno studio approfondito volto all'analisi delle curve di melting ad alta risoluzione. L'analisi in silico condotta e gli studi preliminari in vitro hanno mostrato come questa tecnologia permetta di ottenere la caratterizzazione delle tre specie commercialmente più rilevanti presenti sul mercato nazionale (*T. thynnus*, *T. alalunga* e *T. albacares*).

Un altro caso di studio trattato in questo lavoro è legato allo sviluppo di metodi diagnostici rapidi alternativi al Barcoding per il riconoscimento della specie *Octopus vulgaris*. È stata quindi sviluppata una metodica di PCR *Real-Time* che permettesse di distinguere rapidamente *Octopus vulgaris* dalle altre specie di cefalopodi, con particolare attenzione alle specie morfologicamente più simili con cui è più probabile la frode per sostituzione.

Conseguentemente alla messa a punto del metodo, sono stati analizzati 77 esemplari provenienti da supermercati di 4 province del triveneto. Questa indagine ha messo in luce un'alta percentuale di frode per quanto riguarda *Octopus vulgaris* (51.2%).

Il Barcoding inoltre ha permesso di rilevare la presenza di una forte percentuale di *mislabelling* ossia di errore di etichettatura dei prodotti.

L'approccio proposto in questo lavoro fornisce un valido sistema metodologico per affrontare il problema delle frodi, mediante un'accurata analisi dei mercati e un'attività di sorveglianza mirata ai prodotti maggiormente soggetti a sostituzione.

SUMMARY

The fish sector is a very important in the alimentary production scenario, both for the economic and nutritional aspect.

Lately it has been noticed a growth in the consumption due to the offer of new fish species on the market and to the innovation in the production and distribution.

This improvement led to an increase of the fraud for species substitution problem and to the necessity of new analytical tools to improve the product traceability and authentication.

The Barcoding method, proposed in this PhD work as the gold standard reference method, was used for the creation of a biological and sequence local database, now filled with 40 species with over 400 sequences, resulting in a useful tool for the labs working on the fish species identification.

The database applicability and the Barcoding method reproducibility have then been tested through a ring-trial. The agreement among the labs pointed out the high usability of the method underlining some issues on the interpretation or on the expression of the final result.

While working on the project a surveillance activity on the national market pointed out a greater fraud percentage in some commercial groups (cephalopods, grouper and gadiformes), than other common products as the flat fish.

It was not possible to analyze the frauds referred to the *Thunnus* genus since they were part of groups genetically alike. The study was thus oriented to the high resolution melt analysis (HRMA).

In silico analysis and the previous *in vitro* studies showed how this technology permits to obtain the characterization of the three commercially more important species on the national market (*T. thynnus*, *T. alalunga* e *T. albacares*).

Another case study led to develop rapid alternative diagnostic methods to the Barcoding in order to recognize the *Octopus vulgaris* specie. In particular, the Real-Time PCR method allowed to distinguish rapidly the *Octopus vulgaris* from the other cephalopods species, with a particular attention on the species that are morphologically alike or that are the most involved in the specie substitution fraud. The method was even tested on a set of 77 samples coming from some supermarkets located in 4 provinces in the triveneto territory. This study pointed out a high fraud percentage referring to the *Octopus vulgaris* (51.2%).

The Barcoding also brought up the presence of a strong percentage of mislabeling. Some other factors linked to the fraud are the capture area and the specie declared on the label. The approach suggested gives a valid methodological system to face the fraud issue, through an accurate market analysis and a surveillance activity aimed to the products that are subject to substitution. Moreover, a rigid validation approach is necessary for the biomolecular methods, in order to have the possibility to suggest strong and reliable tools for the species identification to the supervisory authority.

1. INTRODUZIONE

Uno dei più importanti punti di forza del sistema produttivo italiano è rappresentato dall'elevata numerosità di prodotti tipici agro-alimentari. Attualmente quelli riconosciuti di origine animale sono 1.424 (D.M. 350/1999) e di questi, 98 risultano essere prodotti ittici. I prodotti della pesca sono sempre stati considerati dall'uomo un ottimo alimento per le loro caratteristiche nutrizionali e come alternativa al consumo delle carni degli animali allevati o cacciati sulle terre ferme. Il mercato, in questi ultimi decenni, ha cercato di soddisfare la grande richiesta da parte dei consumatori di prodotti della pesca anche attraverso l'aumento degli scambi commerciali e la seguente importazione ed esportazione da ogni parte del mondo (Fig. 1,2,3). Ciò ha comportato un aumento dei rischi sanitari connessi al consumo del pescato. Lo sviluppo degli scambi internazionali insieme all'enorme valore economico e all'intrinseca deperibilità di queste merci, ha inevitabilmente portato a una proliferazione di comportamenti scorretti da parte di commercianti e venditori, mirati a ingannare il consumatore attraverso frodi commerciali e a volte mettendo a volte anche in grave pericolo la salute pubblica. Al riguardo sono stati emanati decreti e regolamenti per tutelare il consumatore, sia nei confronti dei rischi sanitari, sia per l'ambito più strettamente commerciale. L'Autorità competente svolge un ruolo di controllo a tutela della salute pubblica tuttavia, la peculiarità di questa filiera pone dei limiti tecnici e logistici all'attuazione di verifiche più capillari. Va comunque ricordato che responsabile della salubrità dell'alimento è l'operatore del settore alimentare.

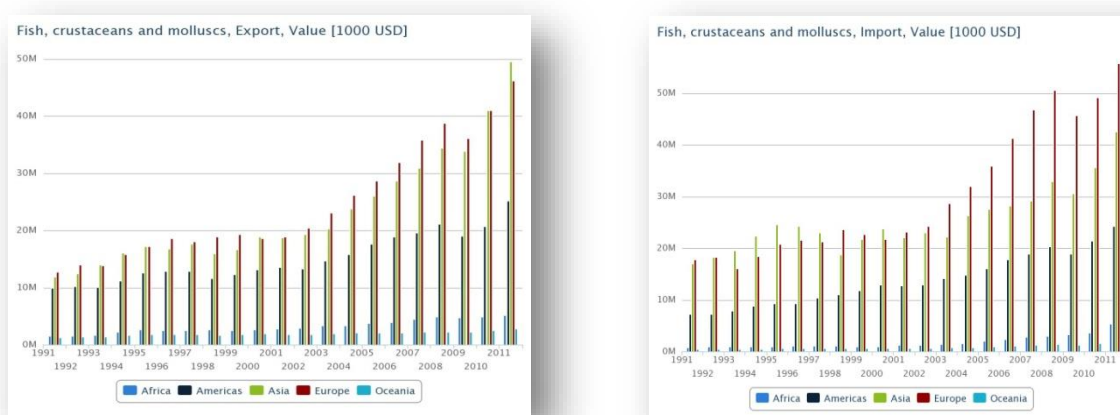


Fig. 1: Andamento delle importazioni e delle esportazioni espresso in migliaia di dollari nel ventennio 1991-2011. (fonte: FAO)

Fishing area code	Fishing area name	2003	2011	2012	Variation	
					(Tonnage)	
21	Atlantic, Northwest	2 293 460	2 002 323	1 977 710	-13.8	-1.2
27	Atlantic, Northeast	10 271 103	8 048 436	8 103 189	-21.1	0.7
31	Atlantic, Western Central	1 770 746	1 472 538	1 463 347	-17.4	-0.6
34	Atlantic, Eastern Central	3 549 945	4 303 664	4 056 529	14.3	-5.7
37	Mediterranean and Black Sea	1 478 694	1 436 743	1 282 090	-13.3	-10.8
41	Atlantic, Southwest	1 987 296	1 763 319	1 878 166	-5.5	6.5
47	Atlantic, Southeast	1 736 867	1 263 140	1 562 943	-10.0	23.7
51	Indian Ocean, Western	4 433 699	4 206 888	4 518 075	1.9	7.4
57	Indian Ocean, Eastern	5 333 553	7 128 047	7 395 588	38.7	3.8
61	Pacific, Northwest	19 875 552	21 429 083	21 461 956	8.0	0.2
67	Pacific, Northeast	2 915 275	2 950 858	2 915 594	0.0	-1.2
71	Pacific, Western Central	10 831 454	11 614 143	12 078 487	11.5	4.0
77	Pacific, Eastern Central	1 769 177	1 923 433	1 940 202	9.7	0.9
81	Pacific, Southwest	731 027	581 760	601 393	-17.7	3.4
87	Pacific, Southeast	10 554 479	12 287 713	8 291 844	-21.4	-32.5
18, 48, 58, 88	Arctic and Antarctic areas	142 548	197 838	178 797	25.4	-9.6
World total		79 674 875	82 609 926	79 705 910		

Fig. 2: Quantità di pescato e variazione percentuale dal 2003 al 2012 e nel biennio 2011-2012 suddiviso per macroaree FAO. Da notare l'incremento costante di pescato nelle aree del Sudafrica (area FAO 47) e delle zone asiatiche (aree FAO 51, 57, 71). (Fonte: FAO)

2012 Ranking	Country	Continent	2003	2011	2012	Variation	
						(Tonnage)	
1	China	Asia	12 212 188	13 536 409	13 869 604	13.6	2.4
2	Indonesia	Asia	4 275 115	5 332 862	5 420 247	27.0	1.7
3	United States of America	Americas	4 912 627	5 131 087	5 107 559	4.0	-0.5
4	Peru	Americas	6 053 120	8 211 716	4 807 923	-20.6	-41.5
5	Russian Federation	Asia/Europe	3 090 798	4 005 737	4 068 850	31.6	1.6
6	Japan	Asia	4 626 904	3 741 222	3 611 384	-21.9	-3.5
7	India	Asia	2 954 796	3 250 099	3 402 405	15.1	4.7
8	Chile	Americas	3 612 048	3 063 467	2 572 881	-28.8	-16.0
9	Viet Nam	Asia	1 647 133	2 308 200	2 418 700	46.8	4.8
10	Myanmar	Asia	1 053 720	2 169 820	2 332 790	121.4	7.5
11	Norway	Europe	2 548 353	2 281 856	2 149 802	-15.6	-5.8
12	Philippines	Asia	2 033 325	2 171 327	2 127 046	4.6	-2.0
13	Republic of Korea	Asia	1 649 061	1 737 870	1 660 165	0.7	-4.5
14	Thailand	Asia	2 651 223	1 610 418	1 612 073	-39.2	0.1
15	Malaysia	Asia	1 283 256	1 373 105	1 472 239	14.7	7.2
16	Mexico	Americas	1 257 699	1 452 970	1 467 790	16.7	1.0
17	Iceland	Europe	1 986 314	1 138 274	1 449 452	-27.0	27.3
18	Morocco	Africa	916 988	949 881	1 158 474	26.3	22.0
Total 18 major countries			58 764 668	63 466 320	60 709 384	3.3	-4.3
World total			79 674 875	82 609 926	79 705 910	0.0	-3.5
Share 18 major countries (percentage)			73.8	76.8	76.2		

Fig. 3: Quantità di pescato e variazione percentuale dal 2003 al 2012 e nel biennio 2011-2012 suddiviso per Stati e Continenti. Da notare come la Cina sia il maggiore produttore al mondo di prodotti della pesca e come vi sia un generale aumento percentuale di produzione nel continente asiatico. (Fonte: FAO)

- *Situazione europea*

I dati FAO (2007) mostrano come la pesca a livello mondiale ha registrato un costante calo in termini percentuali mantenendo comunque un volume di 141 milioni di tonnellate, di cui il 75% è direttamente utilizzato per il consumo umano^[1]. Con una produzione di 7 milioni di tonnellate nel 2005, provenienti sia dalla cattura della flotta comunitaria che dagli impianti di allevamento, l'Unione Europea è la terza potenza mondiale nel settore produttivo ittico.

Nell'Unione Europea il consumo medio procapite nel 2005 era di circa 22 kg, valore molto elevato se comparato a quello degli Stati Uniti con solo 7 kg, ma di molto inferiore rispetto agli stati asiatici dove il consumo medio procapite è di circa 40 kg all'anno (Tab. 1).

L'aumento costante di consumo di prodotti ittici ha portato inevitabilmente a comportamenti scorretti da parte dei commercianti e diversi studi dimostrano come la media dei prodotti frodati sia circa del 37% per quanto riguarda i pesci e del 13% per le altre specie acquatiche (es molluschi e alghe)^[2].

Paesi	Consumo pro-capite annuo nel 2005 (kg)
Portogallo	40,0
Spagna	38,4
Francia	29,0
Italia	23,0
Grecia	22,5
Danimarca	20,5
Belgio – Lussemburgo	21,0
Regno Unito	20,0
Irlanda	16,0
Germania	15,0
Olanda	15,0
UE	22,0

Tab. 1: Consumo *pro capite* di prodotti ittici in alcuni Paesi comunitari riferito all'anno 2005 (ISMEA, 2007)^[3].

- Situazione italiana

A livello nazionale, la categoria che ha registrato il maggiore incremento di acquisto di prodotti alimentari è stata proprio quella dei prodotti ittici (+3,9%), con una preferenza da parte dei consumatori per i prodotti congelati confezionati (Tab. 2). Il consumo ha riguardato circa 455.600 tonnellate che in media corrisponde a 20.9 kg per famiglia acquirente, con un giro di affari che interessa circa 4,35 miliardi di euro l'anno (+10,5%). Diversi studi riportano come il livello di frodi per sostituzione di specie a livello nazionale si attesti tra il 26 e il 41%, a seconda della tipologia di prodotto, con una media del 33.5% [4].

Prodotti	Variazione 2002/'03	Variazione 2003/'04	Variazione 2004/'05	Variazione 2005/'06
Fresco e congelato sfuso	0,2%	5,2%	4,5%	3,5%
Congelato sfuso	-1,9%	5,2%	-1,4%	-0,1%
Congelato confezionato	-2,1%	5,6%	5,8%	9,7%
Conserve semiconserve confezionate	3,6%	-2,0%	1,4%	3,2%
Secco salato sfuso e confezionato	-0,7%	3,0%	2,5%	0,8%
Totale prodotti ittici	0,4%	3,6%	3,5%	3,9%

Tab. 2: Evoluzione degli acquisti domestici di prodotti ittici in Italia per variazione % della quantità.

Fonte: ISMEA ACNielsen, 2006^[2].

1.1. CLASSIFICAZIONE DEI PRODOTTI ITTICI

L'allegato I del Reg. CE 853/2004 fornisce la seguente definizione di prodotto ittico:

“sono prodotti ittici tutti gli animali marini o di acqua dolce (ad eccezione dei molluschi bivalvi vivi, echinodermi vivi, tunicati vivi e gasteropodi marini vivi e di tutti i mammiferi, rettili o rane), selvatici o di allevamento, e tutte le forme, parti e prodotti commestibili di tali animali”.

Lo stesso regolamento suddivide inoltre i prodotti della pesca in tre differenti categorie:

- Prodotti FRESCHI: “i prodotti della pesca non trasformati, interi o preparati, compresi i prodotti imballati sotto vuoto o in atmosfera modificata che, ai fini della conservazione, non hanno subito alcun trattamento diverso dalla refrigerazione, inteso a garantirne la conservazione”;
- Prodotti PREPARATI: “i prodotti della pesca non trasformati sottoposti ad un'operazione che ne abbia modificato l'integrità anatomica, quali l'eviscerazione, la decapitazione, l'affettatura, la sfilettatura e la tritatura”;
- Prodotti TRASFORMATI:” i prodotti risultanti dalla trasformazione, la quale avviene per mezzo di aggiunta di ingredienti (esempio: salamoie, panatura, olio), trattamenti fisici (esempio: congelamento, marinatura, affumicatura, essiccamento) dei prodotti della pesca freschi o dall'ulteriore trasformazione di prodotti già precedentemente trasformati”.

1.2. L'ETICHETTATURA DEI PRODOTTI ITTICI

Il 1° gennaio 2002 sono entrate in vigore le norme comunitarie sull'etichettatura del pesce: in tutti i paesi dell'Unione europea, i prodotti ittici vivi, freschi preparati o lavorati destinati al consumatore finale possono essere commercializzati solo se recano informazioni riguardanti la denominazione commerciale della specie, il metodo di produzione e la zona di cattura o di allevamento. Il sistema di etichettatura, introdotto dal Reg. (CE) n. 104/2000 nell'ambito della riforma dell'Organizzazione comune dei mercati (OCM) della pesca e dell'acquacoltura e disciplinato dal Reg. (CE) n. 2065/2001, è stato applicato in Italia secondo le modalità contenute nel Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e forestali del 27 marzo 2002 (integrato più volte nell'elenco delle denominazioni commerciali, da ultimo dal Decreto ministeriale del 23 dicembre 2010) e in alcune circolari ministeriali (www.regione.veneto.it).

Il Piano Regionale di Sicurezza Alimentare del Veneto del 2005-2007 prevede che i prodotti venduti all'ingrosso riportino in etichetta la denominazione italiana e latina mentre per la vendita al dettaglio di tutti i prodotti (sia freschi che trasformati) ci si possa limitare solo alla denominazione Italiana secondo quanto riportato dal Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 31 Gennaio 2008 e successive integrazioni.

Le normative in materia di rintracciabilità dei prodotti ittici (Reg. CE 104/2000, Reg. CE 2065/2001, Reg. UE 178/2002) nonché i regolamenti UE n. 852, 853 e 854/2004 applicati dal gennaio 2006 sono la dimostrazione di come sia importante per il legislatore tutelare il consumatore nei confronti di azioni fraudolente che possano ledere sia a livello sanitario che commerciale (www.izsvenezie.it).

1.3. LE FRODI ALIMENTARI

I reati quali l'avvelenamento di acque o di sostanze alimentari (art. 439 c.p.), l'adulterazione o contraffazione di sostanze alimentari (art. 440 c.p.), il commercio di sostanze alimentari contraffatte o adulterate (art. 442 c.p.), il commercio di sostanze alimentari nocive (art. 444 c.p.) sono comprese nel Titolo VI del Codice Penale "Dei delitti contro l'incolumità pubblica" ed in particolare nel Capo I "Dei delitti di comune pericolo mediante frode". Altri delitti, quali la frode nell'esercizio del commercio (art. 515 c.p.), la vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine (art. 516 c.p.), la vendita di prodotti industriali con segni mendaci (art. 517c.p.), la contraffazione di indicazioni geografiche o denominazioni di origine dei prodotti agroalimentari (art. 517 c.p.) sono disciplinati nel Titolo VIII "Dei delitti contro l'economia pubblica", Capo II "dei delitti contro l'industria ed il commercio".

Le frodi alimentari vengono usualmente suddivise nelle categorie di seguito descritte (art. 515,516,517 c.p.):

- *Frodi di tipo commerciale:*

Ledono i diritti contrattuali e patrimoniali del consumatore, in altre parole sono "*la consegna all'acquirente di una cosa per un'altra, o diversa da quella pattuita o dichiarata per origine, provenienza, qualità o quantità*". Non vi è un'alterazione della qualità dell'alimento tale da renderlo nocivo e un concreto immediato pericolo per la salute pubblica, ma un illecito profitto al danno del consumatore; per dare origine a una frode commerciale basta apportare una piccola modifica, circa l'origine del prodotto o sulla

provenienza, o sul sistema di preparazione o sulla quantità. Le più comuni frodi commerciali sulle specie ittiche attuate nelle diverse fasi di commercializzazione sono:

- 1) Frode di sostituzione di specie o meglio "*aliud pro alio*" sostituzione di una specie pregiata con un'altra somigliante, ma di minor valore economico sul prodotto intero; alcuni esempi sono lo scambio di totani per calamari, melù per merluzzi, zanchette per sogliole. Questa tipologia di frode avviene soprattutto su prodotti in cui il riconoscimento morfologico sia reso difficoltoso a causa del livello di lavorazione.
- 2) La vendita di un prodotto della pesca decongelato per fresco.
- 3) Vendita di prodotti di allevamento per prodotti pescati.
- 4) Falsa rigidità cadaverica ottenuta in realtà con il freddo, in cella frigorifera qualche ora prima della vendita.
- 5) Aumento di peso rispetto al peso originale, mediante introduzione di scaglie o pezzi di ghiaccio attraverso la bocca dei pesci, o nel mantello dei molluschi cefalopodi, o mediante il rinfresco dei molluschi bivalvi vivi, per mantenere il peso originale al momento dell'acquisto.
- 6) Quantità dichiarata non corrispondente al peso netto, in prodotti della pesca congelati glassati.

- *Frode etico-ambientale*

È un tipo di frode che rientra nella frodi di tipo commerciale ma che ha implicazioni di tipo ambientale o etico. È un diritto del consumatore essere a conoscenza dell'autenticità del prodotto e le motivazioni possono essere le più svariate; fra queste non sono da escludere motivi religiosi come nell'esempio del *kasher* ebraico che nega il consumo di pesci senza pinne e squame come le anguille, gli squali e tutti i crostacei e molluschi e per altri motivi etici che possono comprendere la scelta di rifiutare di consumare un prodotto ittico poiché pescato con metodi non selettivi per una sola specie oppure non eco-sostenibili^[5].

- *Frodi sanitarie*

Sono le azioni compiute che rendono nocivo un alimento e costituiscono un pericolo per la salute pubblica. Tra i "delitti contro l'incolumità pubblica", del Titolo VI, capo II del Codice Penale, gli artt. 439-440-442 e 444 del Codice Penale definiscono come "delitti di comune pericolo mediante frode" i casi di avvelenamento, adulterazione, contraffazione di sostanze alimentari. Commette reato anche chi detiene per il commercio o pone in commercio o distribuisce per il consumo acque, sostanze o cose da altri avvelenate,

adulterate o contraffatte in modo pericoloso per la salute pubblica". Il reato si configura anche per il solo fatto di offrire al consumatore un prodotto contenente sostanze pericolose. Le frodi sanitarie si caratterizzano per:

- Nocività: cioè la capacità, certa e assoluta, basata su riscontri oggettivi e documentati, di provocare danni alla salute umana;
- Pericolosità: cioè l'idoneità a provocare danni alla salute umana, di cui peraltro, non c'è alcun riscontro incontrovertibile documentato^[6].

Le norme che definiscono il concetto di frode nel settore della pesca sono riferibili a:

- Normative commerciali e sanitarie nazionali, tra cui Codice Penale (artt. 439, 440, 444, 515, 516, 517) e legge 283/62.
- Normative comunitarie sulla gestione e tutela delle risorse ittiche marine tra cui Reg. CE 852/04, Reg. 853/04, Reg. 854/04, Reg. 882/04, Reg. CE 2074/05.
- Normative internazionali a protezione delle specie minacciate e a tutela della biodiversità.

Di particolare rilevanza in questo ambito la Convenzione di Washington (Allegati A, B, C, D del Reg. CE 338/97 e succ. mod. Reg. CE 1332/05 sul commercio di flora e fauna selvatica), la direttiva Habitat 92/43/CE e succ. mod. recepita in Italia col D.P.R. 357/97 e succ. mod. D.P.R. 120/03 il cui Allegato II riguarda specie animali e vegetali d'interesse comunitari la cui conservazione richiede la designazione di Zone Speciali di Conservazione e l'allegato IV che riguarda le specie che necessitano di una rigorosa protezione.

1.4. FRODE DI SOSTITUZIONE NEI PRODOTTI DELLA PESCA

Nella accezione di frode per sostituzione commerciale, detta anche "*aliud pro alio*", rientrano quelle frodi che generalmente non configurano un pericolo concreto o potenziale per il consumatore. Sono più numerose delle precedenti descritte e in genere sono effettuate con il semplice scopo di trarne un guadagno. È la sostituzione di una specie pregiata con un'altra somigliante ma di minor valore economico ed è attuata indiscriminatamente sul prodotto fresco, surgelato, intero e porzionato. La molteplicità delle specie presenti in commercio offre, all'esercente disonesto, innumerevoli opportunità di sostituzione. La locuzione "*aliud pro alio*" letteralmente significa "qualcosa per qualcos'altro", nel diritto privato indica la totale difformità del bene consegnato (per esempio in una compravendita) rispetto non solo alle aspettative del compratore, ma anche agli stessi accordi fondanti il rapporto stesso. La frode di sostituzione viene attuata perché in generale il consumatore non è in grado di distinguere piccole differenze anatomiche del prodotto a cui è interessato. È anche vero che la stessa Autorità competente si può trovare in difficoltà, perché se la provenienza è falsata, il riconoscimento tassonomico può risultare difficoltoso se non impossibile.

1.5. METODI IDENTIFICAZIONE DI SPECIE

I metodi ispettivi tradizionali per l'identificazione di specie prevedono l'utilizzo di chiavi morfologiche FAO. È evidente che questo metodo presenta dei limiti notevoli, a partire dall'enorme variabilità delle specie commercializzate, alla necessità di personale altamente specializzato e alla soggettività di un'osservazione, fino al limite reale della metodica che si incontra quando il prodotto è lavorato a tal punto da aver perso l'integrità anatomica e conseguentemente, i punti di repere.

In questi casi varie tecniche di laboratorio vengono efficacemente in aiuto al servizio Veterinario per far fronte ad una richiesta sempre maggiore a tutela del prodotto e del consumatore finale.

Di seguito vengono descritte le principali metodiche che possono essere utilizzate per la certificazione di specie, suddivise a seconda del target in "non basati sull'utilizzo della PCR", nelle quali l'oggetto di studio non è il DNA ma altre molecole, e "basati sull'utilizzo della PCR".

Particolare attenzione verrà posta ai metodi basati sull'analisi del DNA oggetto di questo lavoro.

1.5.1. Metodi non basati sull'utilizzo della PCR

Tra le metodiche più comunemente utilizzate si annoverano:

1.5.1.1. *Isoelettrofocalizzazione (IsoElectrofocusing-IEF)*

Una metodica grazie alla quale le proteine vengono separate su un supporto solido, molto spesso un gel, in base al loro punto isoelettrico^[7]. Nel 1995 la Food and Drug Administration (FDA) ha ufficializzato la Focalizzazione Isoelettrica come metodo di identificazione delle specie ittiche, e nel 1997 ha pubblicato in rete un database contenente gli standard elettroforetici di 56 specie tra quelle maggiormente commercializzate nei mercati Statunitensi.

I vantaggi dell'IEF sono molteplici come ad esempio la semplicità di esecuzione, un ottimo potere discriminante tra le specie e la creazione di una mappa specie-specifica tipica di ogni specie ittica quando applicata al prodotto crudo sotto forma di tranci e filetti, mentre può presentare dei limiti se applicata a prodotti trasformati^[7]. In particolare i prodotti che hanno subito trattamenti termici quali cottura o pastorizzazione risultano particolarmente ostici da analizzare per via della bassa stabilità termica delle proteine.

Grazie all'impiego di questa metodica nel 2009 è stata svelata una frode dovuta alla sostituzione di pesce dichiarato come gallinella con pesce della specie *Pangasius hypophthalmus*^[8].

1.5.1.2. *Elettroforesi capillare (Capillary Electrophoresis-CE)*

Utilizzata per separare le molecole in base alle cariche ioniche. Nel 1995 questa tecnica è stata utilizzata per l'analisi di identificazione di specie su proteine del sarcoplasma di pesci pleuronettiformi. I vantaggi legati all'uso di questa tecnica sono la rapidità e la riproducibilità dell'analisi e la maggior risoluzione e il prezzo inferiore rispetto all'analisi HPLC in quanto prevede un minor utilizzo di reagenti^[9].

1.5.1.3. *HPLC (High Performance Liquid Chromatography)*

Tecnica cromatografica che permette di separare due o più composti presenti in un solvente in base al peso molecolare. Nel 1992 è stata messa a punto una metodica basata sull'identificazione di 15 specie di pesci australiani grazie all'analisi HPLC delle proteine sarcoplasmatiche. Tale metodica è applicabile sia a proteine estratte da pesci appena pescati, sia irradiati con raggi gamma o con infrarossi. Uno dei vantaggi maggiori nell'uso di questa tecnica sta nel tempo ridotto di preparazione del campione^[10].

Tali metodiche risultano poco riproducibili in quanto l'espressione proteica varia in base al soggetto e alle sue caratteristiche (età, sesso, area di pesca, periodo di pesca) e devono quindi contemplare la variabilità legata all'espressione proteica. Queste tre tecniche inoltre sono poco efficaci se il campione analizzato ha subito trattamenti termici.

1.5.1.4. Saggio ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

Basato sull'analisi degli anticorpi specifici, è stato usato per l'identificazione di diverse specie ittiche^[11]. Il limite maggiore di quest'ultima tecnica di riconoscimento sta nella sua bassa specificità: è infatti molto difficile discriminare due specie molto affini con anticorpi comuni e dunque è necessario sviluppare degli anticorpi specifici per ogni specie. Inoltre possono avvenire reazioni di cross-reattività a causa di anticorpi che riconoscono epitopi diversi con diversa affinità.

1.5.2. Metodi basati sull'utilizzo della PCR

L'uso di tecniche di identificazione basate sul DNA presenta alcuni vantaggi rispetto a quelli basati sulle proteine inclusi la specificità, la sensibilità e la ripetibilità anche in campioni processati. Infatti il DNA è più termostabile delle proteine e frammenti di DNA di circa 300 pb possono essere ancora ritrovati dopo il processo di sterilizzazione. Un altro vantaggio a favore dello sviluppo di metodiche basate sull'analisi del DNA è dovuto al fatto che il patrimonio genetico risulta il medesimo in ogni cellula somatica dell'organismo analizzato mentre l'espressione proteica varia da tessuto a tessuto^[12].

1.5.2.1. Disegno dei primer

A differenza di ciò che accade normalmente nelle cellule, ciò che vogliamo ottenere in vitro è l'amplificazione di uno specifico segmento del DNA di partenza. Per fare in modo che venga amplificato durante la reazione solo la sequenza di interesse è fondamentale la scelta di primer corretti. Come già anticipato i primer sono delle sequenze oligonucleotiche che, ibridandosi ad entrambi i filamenti del DNA denaturato, fungono da innesco per la Taq polimerasi per iniziare la polimerizzazione del nuovo filamento.

Primer troppo corti sono poco specifici avendo alte probabilità di trovare diverse zone di complementarità nel genoma. La lunghezza ideale dunque per i primer è compresa tra i 18 e i 24 nucleotidi fatta eccezione per alcune metodiche che utilizzano primer di grandezze diverse. In linea di massima primer più corti permettono l'amplificazione di più

zone del DNA e primer più lunghi rendono la metodica più specifica. Altri criteri influenzano la funzionalità di un primer, quali la presenza di guanina e citosina. Per una coppia di primer infatti che abbia una temperatura di melting compresa tra 56°-62°C deve esserci una presenza di guanina e citosina compresa tra il 45 e il 60% del totale delle basi che compongono la sequenza del primer. La presenza di sequenze ripetute o complementari, che possono dare luogo alla formazione di cosiddette “forcine” o “*hairpin*” o all’appaiamento dei primer tra di loro o a “*primer dimer*” nel caso le sequenze dei primer dovessero essere complementari tra loro o all’interno del primer stesso costringendolo a ripiegarsi su se stesso. Inoltre i primer che vanno a costituire il set che andrà ad agire nella reazione di amplificazione devono avere temperature di *annealing* simili^[13].

Per riuscire a disegnare delle coppie di primer efficienti e funzionali è fondamentale uno studio in silico eseguito in maniera corretta e completa.

Per tutti i primer disegnati per la messa a punto di questo lavoro è stato seguito il procedimento descritto di seguito.

In primo luogo sono state scaricate dai database pubblici NCBI e BOLD almeno 10 sequenze per ogni specie in esame, comprendendo specie geneticamente o morfologicamente vicine.

Successivamente, grazie all’utilizzo del software Mega, le sequenze vengono allineate e viene creata una sequenza consenso utilizzando il codice internazionale mostrato in Tab. 3. A questo punto tutti i consensi ottenuti vengono a loro volta allineati e analizzati in maniera tale da poter ricercare regioni idealmente ottimali su cui disegnare i primer.

Ultimo step dell’analisi in silico antecedente all’applicazione di qualsiasi metodica basata sull’utilizzo della PCR consiste nella valutazione dei parametri chimico-fisici dei primer disegnati. Questo viene effettuato mediante l’utilizzo del *software PRIMER 3*, il quale è strutturato in due parti: la prima componente permette di agire sulla sequenza *target* dando informazioni relative alla posizione dei *primer* creati, nella seconda parte invece si indicano le caratteristiche che dovrebbero avere i primer (www-genome.wi.mit.edu).

symbol	base	symbol	base
A	adenosine	M	A C (amino)
C	cytidine	S	G C (strong)
G	guanine	W	A T (weak)
T	thymidine	B	G T C
U	uridine	D	G A T
R	G A (purine)	H	A C T
Y	T C (pyrimidine)	V	G C A
K	G T (keto)	N	A G C T (any)

Tab. 3: Codifica IUPAC per la nomenclatura dei nucleotidi

I parametri principali da tenere in considerazione sono i seguenti:

- La temperatura di *Melting* (T_m) dei *primer* dipende dal loro contenuto in G+C, dalla loro lunghezza e quindi dalla temperatura di fusione tra *primer* e l'elica complementare sul DNA stampo. Considerando *primer* di lunghezza media di 20 basi, una formula empirica spesso utilizzata per il calcolo della T_m è la seguente:

$$T_m = [4(G + C) + 2(A + T)] \text{ } ^\circ\text{C}.$$
Dove G, C, A e T indicano il numero di nucleotidi contenenti le basi azotate guanina, citosina, adenina o timina. Nel caso che i due *primer* abbiano T_m diverse generalmente viene considerata quella più bassa.
- La concentrazione di Mg^{2+} nel buffer influenza l'appaiamento delle coppie di *primer* allo stampo. Maggiore è la concentrazione di $MgCl_2$ minore è la specificità dell'appaiamento. La variazione delle concentrazioni di $MgCl_2$ gioca quindi un ruolo simile (ma opposto) a quello della temperatura di *annealing* (T_a) e spesso la messa a punto di un'elevata (o bassa) stringenza (specificità) nella PCR è basata tanto sulla T_a quanto sulla concentrazione di $MgCl_2$.
- Due parametri importanti da considerare sono la *Max (Self) Complementary* e *Max 3' (Self) Complementary* in cui vengono valutati i livelli di complementarità tra i *primer* e nella regione del 3', in modo da evitare la formazione di dimeri e di strutture secondarie. Il valore *any* indica la complementarità tra i *primer* e deve avere un valore compreso tra 2.0 – 4.0.

1.5.2.2. PCR *end-point*

La PCR è una tecnica che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico (Fig. 5). Innanzitutto è necessario estrarre il DNA dal campione mediante l'utilizzo di metodiche specifiche o di kit commerciali. Successivamente il DNA estratto viene amplificato utilizzando una coppia di *primer* per una specifica regione genica. Scegliendo come sequenze da amplificare frammenti di DNA specie-specifico, è possibile distinguere e identificare le diverse specie animali. In breve, la tecnica consiste nell'individuare un gene o una porzione di gene comune al gruppo considerato, disegnare delle coppie di *primer* che permettano di amplificare migliaia di volte il gene o la porzione di gene d'interesse, infine ottimizzare la tecnica elettroforetica in grado di rilevare i frammenti (ampliconi) ottenuti (Fig. 5). La fase di amplificazione si suddivide in tre step fondamentali, definiti cicli, che vengono ripetuti tra le 30 e le 50 volte:

1. La mix di reazione composta da desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, *primer*, TAQ polimerasi e contenente il DNA da replicare viene portata a una temperatura compresa tra 94 e 99 °C. Ci si trova, di conseguenza, in una situazione in cui i legami che tengono appaiati i due filamenti della doppia elica vengono completamente scissi (fase di denaturazione).
2. Successivamente vi è un decremento della temperatura fino ad un valore preciso (discriminante per ogni coppia di *primer*) al fine di permettere il legame dei *primer* alle regioni complementari sui filamenti di DNA denaturati (fase di *annealing*).
3. Infine la temperatura viene alzata fino a 65-72 °C allo scopo di massimizzare l'azione della TAQ polimerasi determinando un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (fase di estensione).

Ad ogni ciclo di PCR, in condizioni ottimali, vi sarà un incremento esponenziale della quantità di DNA target, fino ad ottenere un numero tale di copie da permetterne la visualizzazione a seguito dell'incorporazione di un intercalante aspecifico (etidio di bromuro o similari) e la successiva elettroforesi in gel (gel d'agarosio o gel di poliacrilammide) (Fig. 4).

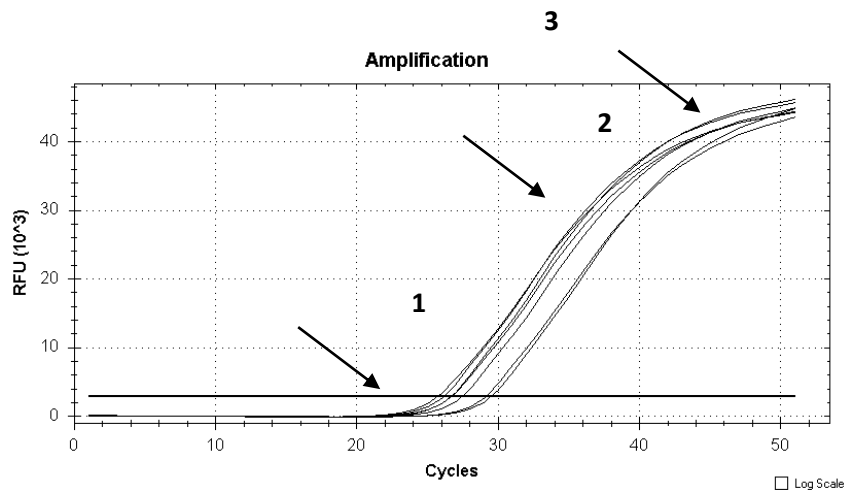


Fig. 4: schema dell'andamento della reazione di PCR (Fonte: www.gene-quantification.de)

L'amplificazione di ogni *target* è definita da tre diverse fasi (Fig. 4)

1. prima fase esponenziale; durante questa fase la reazione di PCR raggiunge uno stato di amplificazione ottimale in cui teoricamente i prodotti di PCR raddoppiano ad ogni ciclo in condizioni ideali. Tutti i reagenti indispensabili sono presenti.
2. seconda fase esponenziale; i reagenti cominciano a diventare limitanti e l'amplificazione del target avviene più lentamente
3. fase di *plateau*; ovvero in una condizione in cui tutti i reagenti sono esauriti e non si osserva un incremento dei prodotti^[14].

Nel caso di una PCR *end-point*, l'unica fase apprezzabile è la terza in quanto non vi è la possibilità di monitorare l'andamento delle curve di amplificazione.

Oltre ad un'ottimizzazione dei profili di amplificazione, la qualità del DNA presente nei campioni è particolarmente importante per l'analisi in PCR. La lunghezza media dei frammenti di DNA presenti nel campione di prova è un importante parametro di qualità del DNA; infatti è essenziale che la dimensione media dei frammenti di DNA nel campione non sia significativamente più piccola della sequenza bersaglio nelle analisi. La degradazione del DNA presente nel campione da testare, nel caso specifico di alimenti, dipende soprattutto dai processi chimici, fisici o enzimatici che esso subisce durante la trasformazione tecnologica. È importante inoltre che le metodiche di estrazione assicurino l'assenza di inibitori della PCR in quanto la presenza di inibitori co-estratti insieme al DNA è uno dei maggiori problemi nelle successive analisi del campione; gli inibitori della PCR comprendono composti organici e fenolici, glicogeno, grassi, collagene^[15].

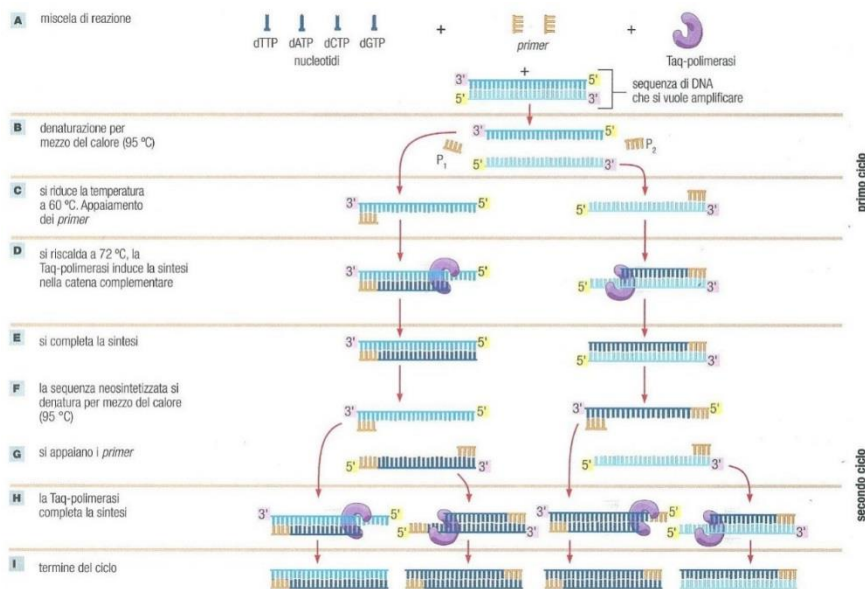


Fig. 5: Rappresentazione del meccanismo di amplificazione del DNA nella reazione di Polymerase Chain Reaction (PCR). (Fonte: arisperto.blogspot.it)

La reazione di PCR può essere seguita da una restrizione enzimatica (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*), una tecnica largamente utilizzata in passato e, in misura minore, ancor oggi utilizzata per casi particolari^[16,17,18,21].

Questa applicazione post-PCR prevede la digestione del prodotto di amplificazione mediante enzimi specifici, la successiva analisi dei pattern di restrizione dopo corsa in gel di agarosio.

Questo metodo ha il considerevole svantaggio di avere la necessità di campioni di confronto per ogni specie analizzata e, visto l'elevatissimo numero di specie riconosciute e il costante incremento di nuove specie commercializzate, risulta di difficile applicabilità in realtà diagnostiche.

1.5.2.3. *Barcoding*

Tra le tecniche basate sull'utilizzo della PCR *end-point*, il DNA Barcoding è certamente la più utilizzata a livello internazionale per l'identificazione di specie.

Tale metodo, nato con lo scopo di riconoscere le specie di metazoi^[19], prevede l'amplificazione ed il sequenziamento di un tratto di circa 700 paia di basi del gene mitocondriale codificante per la Citocromo Ossidasi subunità I (COI o CoxI).

Il DNA mitocondriale è aploide a trasmissione uniparentale materna^[20] (tranne alcuni casi di *Duobly Uniparental Inheritance-DUI* osservati in alcune specie di molluschi bivalvi), è scarsamente soggetto a fenomeni di ricombinazione e, a livello intraspecifico, si può assimilare ad un clone.

Queste caratteristiche, assieme al fatto che questa tipologia di DNA presenta un tasso di sostituzione nucleotidica maggiore rispetto al genoma nucleare e quindi maggiori zone polimorfiche a livello interspecifico, lo rendono target ottimale per le analisi di identificazione e caratterizzazione di specie.

Anche a livello sperimentale l'utilizzo del mtDNA presenta dei vantaggi quali una notevole resistenza alla denaturazione dovuta alla sua conformazione circolare e la sua abbondanza relativa nelle cellule (è presente in numero variabile da 100 a 10000 copie per cellula), che lo rendono particolarmente adatto all'analisi di matrici alimentari sottoposte a trattamenti termici.

I geni mitocondriali maggiormente considerati per gli studi di identificazione di specie sono: il COI, l'NADH2, 12S e 16S e il CYTB^[21] anche se, negli ultimi anni, il gene codificante per la citocromo ossidasi I si è affermata come standard per l'analisi di Barcoding nel regno animale.

Questo tipo di analisi prevede fondamentalmente tre fasi distinte (Fig. 6):

- l'estrazione del DNA totale e l'amplificazione tramite PCR attraverso una coppia di *primer* universali che amplificano un tratto di circa 650 paia di basi^[19],
- sequenziamento dell'amplificato
- allineamento della sequenza ottenuta con le sequenze depositate nei database pubblici (BOLD, GenBank, Ittiobase).

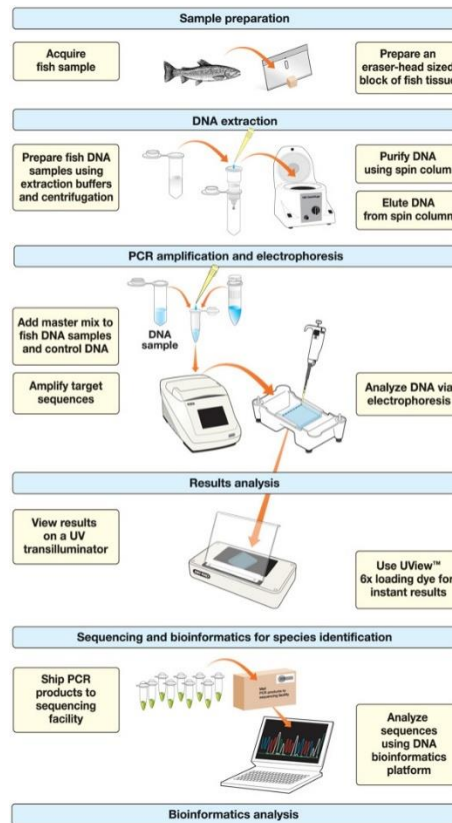


Fig. 6: Rappresentazione del processo di Barcoding. (Fonte: www.bio-rad.com)

Le varie specie che vengono studiate e identificate in modo certo con il metodo delle chiavi dicotomiche, vengono sequenziate e le sequenze di COI corrispondenti vengono depositate all'interno dei database permettendo così di avere una base di confronto valida per gli studi di identificazione di specie. Gli algoritmi di allineamento delle sequenze permettono di confrontare la propria sequenza con tutte quelle depositate, fornendo come output una lista di specie ordinate per percentuale di similarità.

Il limite principale della metodica del Barcoding è dato dalla necessità imprescindibile di confrontare la sequenza del campione incognito con quelle presenti all'interno di database pubblici i quali, seppure in maniera limitata, contengono degli errori nelle sequenze registrate e delle lacune per quanto riguarda specie poco studiate.

Un altro limite di questa tecnica è dovuto all'impossibilità di analizzare miscugli in quanto i *primer* per l'amplificazione del gene in questione andrebbero ad amplificare in modo casuale il tratto genomico di tutti gli organismi presenti nel miscuglio rendendo così impossibile il sequenziamento.

Il metodo del Barcoding è ormai universalmente riconosciuto nella comunità scientifica come GOLD standard per l'identificazione di specie, con numerose pubblicazioni di gruppi di ricerca di tutto il mondo^[22, 23].

1.5.2.4. *PCR Real-Time*

Il Sistema di *Real-Time* PCR è composto da un termociclatore dotato di un rivelatore a fluorescenza, che permette l'acquisizione in tempo reale della fluorescenza emessa dal DNA target opportunamente trattato. La tecnologia della *PCR Real-Time*, introduce nuove possibilità rispetto alla *PCR end-point* poiché rende realizzabile la misurazione diretta e la quantificazione della reazione mentre l'amplificazione è in atto.

Per fare ciò i campioni vengono irradiati da una sorgente a singola o ad ampio spettro di lunghezza d'onda, e, a seconda della strategia adottata, la fluorescenza emessa dai campioni viene rilevata da una telecamera CCD, il tutto controllato da software dedicati^[24]. La curva di amplificazione che deriva da una PCR, ossia il diagramma del segnale di fluorescenza ottenuto rispetto al numero di cicli, è solo teoricamente di tipo esponenziale. In realtà, dopo la prima fase esponenziale, in cui nessuno dei componenti della reazione è limitante, tende ad assumere un andamento di tipo lineare ed eventualmente raggiunge un plateau. Poiché vi sono numerosi fattori che influiscono sull'andamento delle curve di amplificazione, la misurazione della reazione in fase finale non risulta direttamente connessa con l'ammontare iniziale di DNA *target*. La possibilità di seguire le reazioni in tempo reale permette di analizzarle nel momento in cui l'amplificazione è in fase esponenziale. L'andamento delle reazioni viene visualizzato in un grafico nel quale per ogni campione viene indicata la quantità di fluorescenza emessa (asse y), misurata in ogni ciclo di reazione (asse x). I primi cicli della *Real-Time* PCR, in cui non è misurabile una variazione nel segnale della fluorescenza, definiscono un primo importante parametro: la linea di base (*baseline*) della curva. Un significativo incremento della fluorescenza oltre la linea di base indica l'inizio della reazione di amplificazione. Un secondo parametro importante è la linea-soglia: tale linea, parallela alla linea di base, deve intersecare le curve dei campioni nella loro fase di crescita esponenziale. Appare da subito chiaro quanto sia importante, ai fini della quantificazione del DNA iniziale nei campioni, un corretto posizionamento di tale linea, che può essere definita in vari modi (automatico, semi-automatico o manuale). La curva di amplificazione di ogni campione interseca la linea-soglia in un punto, chiamato ciclo-soglia (*threshold cycle*), definibile come il ciclo di

PCR (o frazione di ciclo), in cui il valore di fluorescenza di un campione supera in maniera apprezzabile un valore soglia impostato sulla base di una standard noto. Il ciclo-soglia, al contrario di un valore misurato alla fine dell'amplificazione, è dunque un parametro quantitativo in quanto risulta inversamente proporzionale alla quantità di DNA presente all'inizio della reazione. La tecnologia della PCR *Real-Time* prevede l'uso di intercalanti del DNA oppure di sonde specifiche.

Esistono diversi tipi di molecole in grado di intercalarsi al DNA doppia elica e ognuna ha proprietà specifiche e distinte. In generale essi si legano in maniera completamente specifica alla doppia elica in formazione e emettono un fluorescenza solamente in questa condizione^[25].

- *Intercalanti non-saturanti*

Il SYBR® Green 1 è tra gli intercalanti non saturanti più comuni. In particolari condizioni potrebbe stabilizzare il DNA doppio filamento e inibire la DNA polimerasi. Per evitare ciò è importante utilizzare nella mix di reazione una bassa concentrazione di intercalante. A basse concentrazioni il SYBR® Green 1 è in grado di ridistribuirsi dal DNA che si sta denaturando e le nuove doppie eliche in formazione andando così ad alterare la lettura della fluorescenza (Fig. 7).

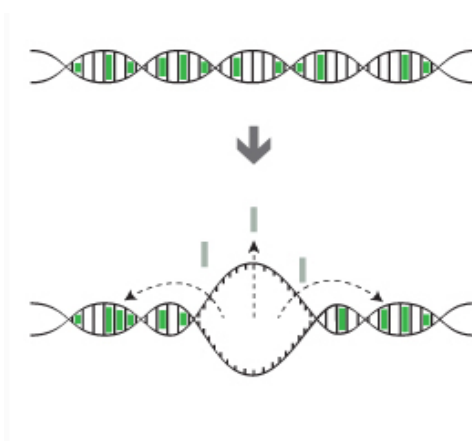


Fig. 7: Rappresentazione di come la molecola SYBR® Green 1 si intercali nel doppio filamento di DNA.

(Fonte: www.kapabiosystems.com)

- *Intercalanti saturanti*

Per superare questo limite è stata creata una nuova classe di intercalanti che non inibisce la polimerasi e non altera la temperatura di denaturazione del DNA. Queste molecole possono essere utilizzate a concentrazioni più alte rispetto a quelle non-saturanti, assicurando così una completa intercalazione dell'amplicone. Questo tipo di intercalante non è in grado di ridistribuirsi durante la denaturazione del doppio filamento, in quanto tutti i siti di attacco sono occupati (Fig. 8).

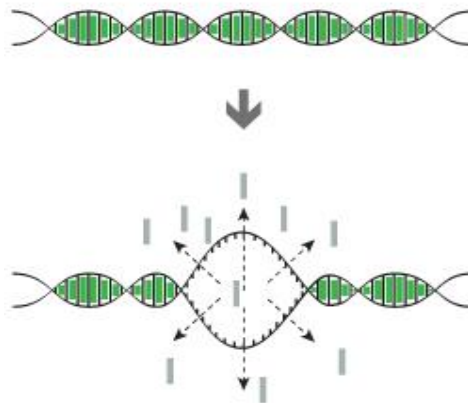


Fig. 8: Rappresentazione di come la molecola intercalante non saturante si intercala nel doppio filamento di DNA.
(Fonte: www.kapabiosystems.com)

- *Intercalanti Release-on-demand*

Questi possono essere usati ad alte concentrazioni in modo da saturare il doppio filamento di DNA, senza per questo dover modificare la temperatura di *Melting*, cosa che non avviene utilizzando intercalanti di seconda generazione. La capacità saturante dell'intercalante consente di avere un segnale direttamente proporzionale alla quantità di amplicato, in quanto l'errore dovuto alla redistribuzione del fluoroforo nelle regioni non ancora denaturate viene annullato (Fig. 9).

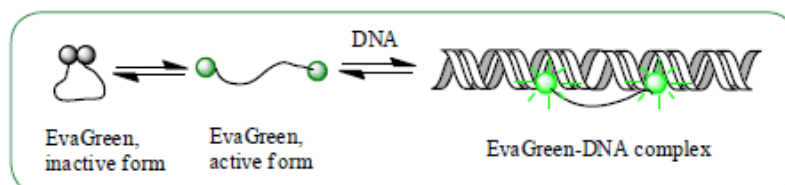


Fig. 9: Rappresentazione del meccanismo di intercalazione del fluoroforo (Fonte: www.atdbio.com)

- *Sonde Specifiche*

Le sonde specifiche sono composte da una o più sequenze di DNA che si ibridano in modo altamente specifico con l'amplificato. Tra le sonde a idrolisi troviamo le sonde *TaqMan*. La sonda *TaqMan*, è un oligonucleotide complementare ad una determinata sequenza di DNA individuata all'interno della sequenza amplificata dai *primers*, presenta una molecola "Reporter" all'estremità 5' e una molecola "Quencher" al 3'. Il "Quencher" impedisce al "Reporter" di emettere liberamente segnale mediante il meccanismo del trasferimento dell'energia denominato *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) (Figg. 10,11). Durante la fase di estensione, la polimerasi, che sta sintetizzando sul DNA template il secondo filamento a partire da una coppia di *primer*, incontra l'estremità 5' della sonda, anch'essa legatasi al template, ed effettua uno "*strand-displacement*", ossia stacca la sonda dal template per una lunghezza di alcuni nucleotidi e la taglia. In questo modo la molecola reporter passa in soluzione, aumentando l'intensità della fluorescenza che sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di amplificato^[25].

Le metodiche di PCR Real Time in cui viene implementato l'utilizzo di una sonda sono molto più specifiche rispetto alle metodiche che utilizzano fluorofori intercalanti, anche se in genere sono meno sensibili. Lo svantaggio dell'uso della sonda è legato alla difficoltà di implementazione della metodica, in quanto oltre a creare dei primer specifici per la sequenza che si vuole amplificare, è necessario disegnare una sonda tanto specifica da consentirne l'ibridazione con la sequenza target all'interno della sequenza amplificata e quindi l'emissione della fluorescenza. È comunque fondamentale fare un attento disegno *in silico* della sonda in modo da renderla il più specifica possibile.

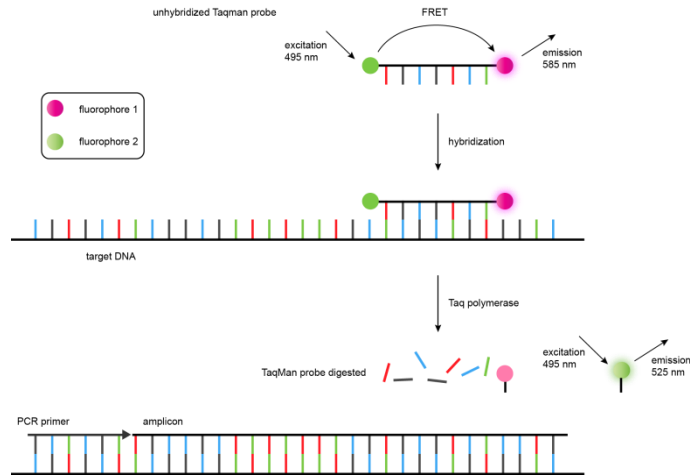


Fig. 10: Rappresentazione grafica del meccanismo del trasferimento dell'energia denominato *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) (Fonte: www.atdbio.com)

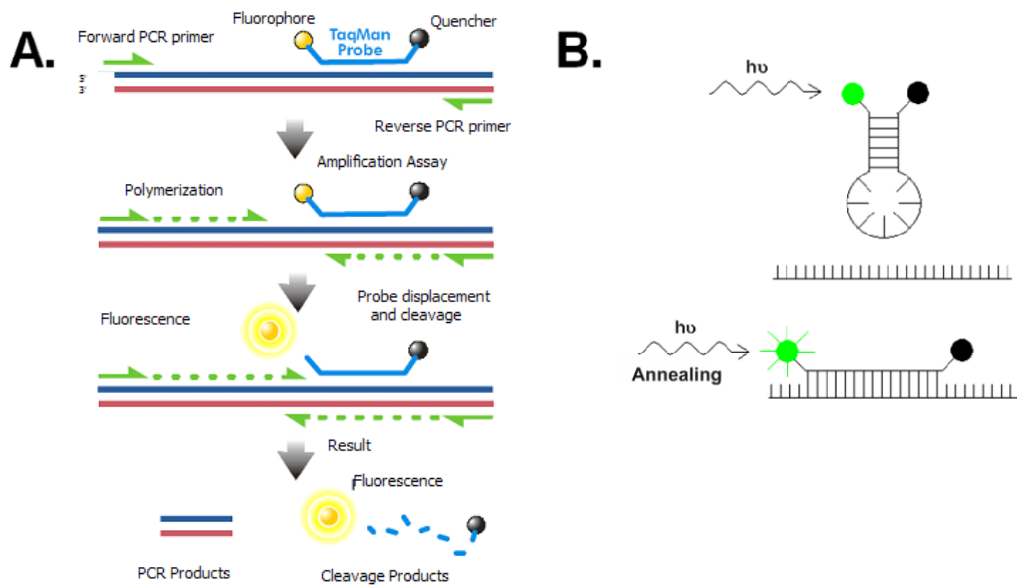


Fig. 11: Rappresentazione del meccanismo d'azione delle sonde *TaqMan* (A) e *Molecular Beacon* (B). (Fonte: www.eligene.com)

Diversi sono i lavori che utilizzano la metodica Real-Time PCR per l'identificazione di specie, solitamente focalizzati su casi particolari in cui non vi sia la necessità di un'indagine ad ampio spettro come il Barcoding ma si debba analizzare un gruppo noto di specie^[26].

1.5.2.5. *High Resolution Melt Analysis HRMA*

L'analisi ad alta risoluzione delle curve di Melting, in inglese *High Resolution Melt Analysis* o HRMA, è una moderna tecnica in grado di caratterizzare gli amplificati di PCR e di analizzare variazioni genetiche come le mutazioni, gli SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e le metilazioni presenti nei DNA a doppio filamento (*double stranded DNA – dsDNA*). Questo metodo permette di distinguere gli ampliconi sfruttando il diverso andamento del processo di denaturazione delle sequenze; questo andamento è legato alla lunghezza dell'amplificato (numero di basi), alla composizione in basi (ovvero il contenuto di GC) e alla complementarità della sequenza stessa del DNA. La tecnica utilizza molecole fluorescenti che si intercalano esclusivamente al *dsDNA*^[27]. Durante la reazione di amplificazione la concentrazione di DNA e quindi la fluorescenza aumentano in maniera esponenziale per poi arrivare rapidamente a plateau tra il 35° e il 40° ciclo. Dopo l'amplificazione, i campioni subiscono una denaturazione progressiva e controllata da 60° a 90°C e la variazione dell'emissione di fluorescenza viene monitorata per generare una curva di dissociazione (Fig. 12). Il segnale di fluorescenza andrà in decadimento con il progressivo aumentare della temperatura, in quanto il fluoroforo viene rilasciato dal *dsDNA* (*double strand DNA*) che si dissocia in *ssDNA* (*single strand DNA*). La temperatura alla quale il 50% del DNA si trova in forma denaturata viene denominata "temperatura di *Melting*". Ad ogni prodotto di PCR corrisponde una temperatura di *Melting* caratteristica, perciò tramite questo tipo di analisi è possibile distinguere i diversi genotipi. Tramite l'analisi HRM è possibile visualizzare le curve di dissociazione in maniera estremamente più dettagliata e, in base alle differenti forme che assumono, si possono confrontare le sequenze di due campioni di DNA.

I risultati sono paragonabili ai più lunghi e più costosi metodi convenzionali come SSCP, DHPLC, RFLP, inoltre l'analisi HRM possiede una sensibilità maggiore.

Questo metodo, attraverso l'utilizzo di software dedicati, consente di seguire l'andamento della reazione di amplificazione in tempo reale e successivamente di analizzare la curva di dissociazione. La curva riportata in Fig. 12 mostra una diminuzione della fluorescenza con l'aumentare della temperatura mano a mano che il fluoroforo è rilasciato dal *dsDNA* che si dissocia in *ssDNA*. Si possono distinguere una fase di *pre-melt* (in cui la maggior parte del DNA è ancora a doppio filamento) e una fase di *post-melt* (in cui il DNA è quasi tutto a singolo filamento). La sigla "TM" indica la temperatura di *Melting*^[27].

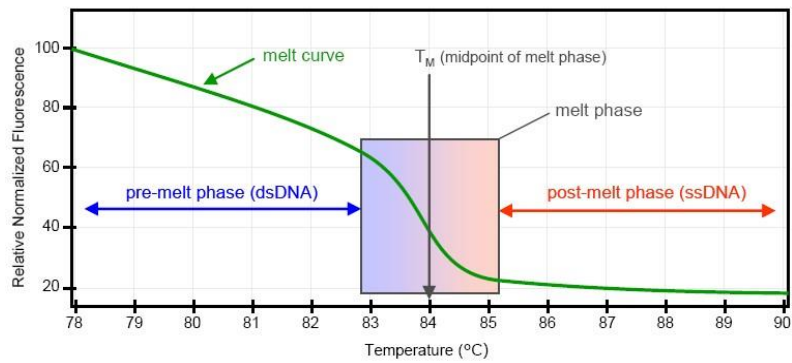


Fig. 12: Grafico esemplificativo di una curva di dissociazione.

Fondamentale per incrementare la precisione dell'analisi è l'utilizzo di fluorofori intercalanti di terza generazione.

Il tasso di errore nel rilevare la variazione di sequenza dipende principalmente dalla lunghezza del prodotto di PCR (Fig. 13) e dal tipo di cambiamento molecolare: è stato osservato che la maggior parte degli SNPs non rilevati, sono localizzati in sequenze ricche in AT e coinvolgono un cambiamento T>A o A>T. Al contrario la posizione della variazione non produce alcun effetto sull'accuratezza del metodo. Reed G. e Wittwer C. hanno pubblicato nel 2004 un lavoro di valutazione della sensibilità e specificità dell'*High Resolution Melting Analysis*^[27]. Lo studio è stato condotto valutando la capacità della metodica di rilevare variazioni di sequenza in funzione della lunghezza del prodotto di PCR (da 50 a 1000 bp), della posizione dello SNP all'interno dell'amplificato e della percentuale di GC contenuta (40%, 50% e 60%)^[28].

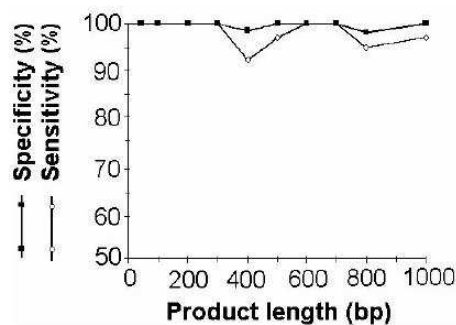


Fig. 13: Effetto della lunghezza del prodotto di PCR sulla sensibilità e la specificità della tecnica di identificare SNP^[28]

- *Rappresentazione grafica di un analisi HRM*

La Fig. 14 riporta le fasi di un processo di amplificazione dove il DNA di interesse viene amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi (Fig. 14, fase A).

Una volta terminata la fase di amplificazione incomincia una fase di denaturazione controllata durante la quale, attraverso un progressivo incremento della temperatura (Fig. 14, fase B), il *dsDNA* (*double strand* DNA) inizia a denaturarsi con conseguente perdita di fluorescenza. Alla fine del processo di denaturazione un software dedicato definisce la temperatura di *Melting* (T_m) (Fig. 14, fase C) ed è possibile visualizzare uno zoom della curva di dissociazione (Fig. 14, fase D) e il grafico delle differenze del decadimento della fluorescenza tra i campioni in analisi (Fig. 14, fase E).

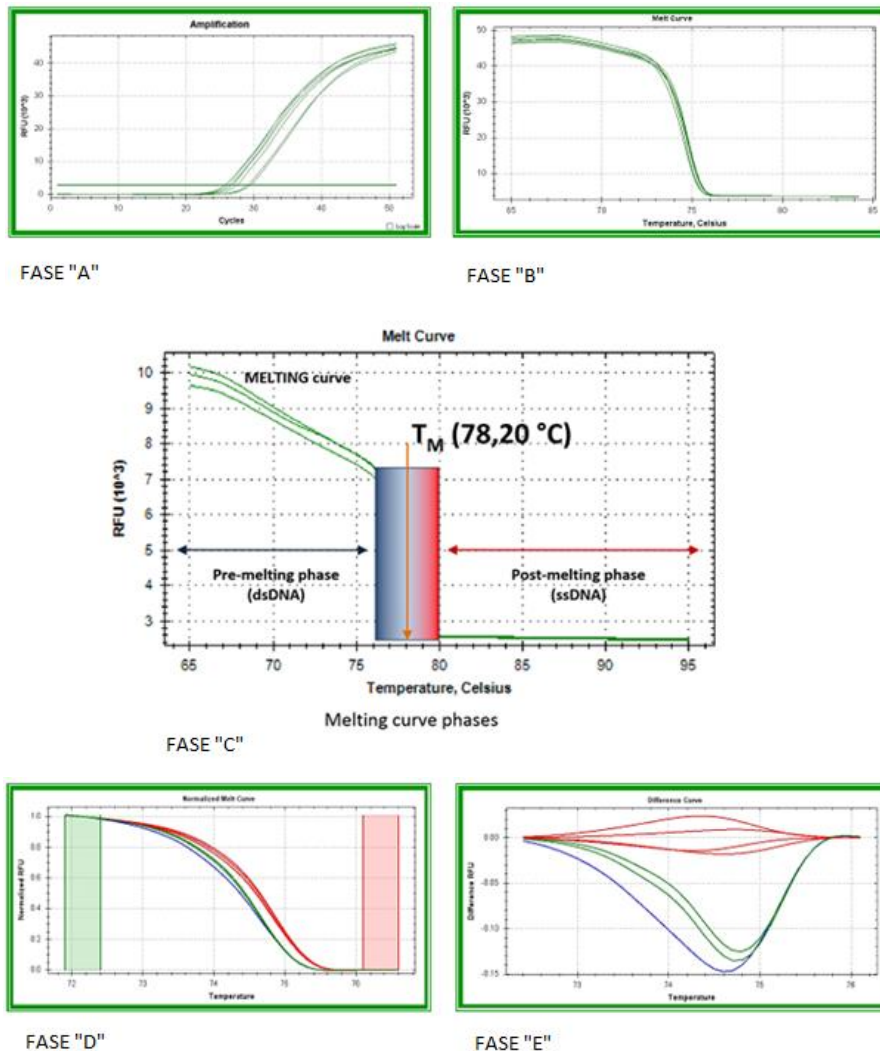


Fig. 14: Rappresentazione grafica delle fasi di lavoro con l'utilizzo delle HRM^[29].

- *Problematiche ricorrenti*

L'alta sensibilità dell'analisi di melting ad alta risoluzione comporta un'elevata influenza da parte di piccole variazioni dei parametri in gioco^[29]. Le problematiche più frequenti sono principalmente due:

- 1) *Clustering* non definiti
- 2) Amplificazione insufficiente

- *Clustering* non definiti:

Nella Figura 15A è rappresentata una situazione in cui le curve di melting dei campioni in analisi non sono ben definite e, di conseguenza, il risultato è difficilmente interpretabile. Al contrario, nella Figura 15B, è possibile notare come un cluster ben definito porti anche ad una chiara interpretazione del risultato^[29].

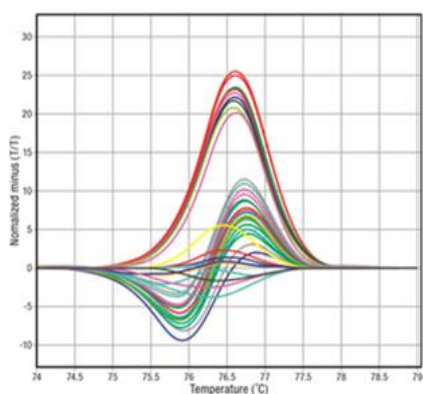


FIGURA 15 "A"

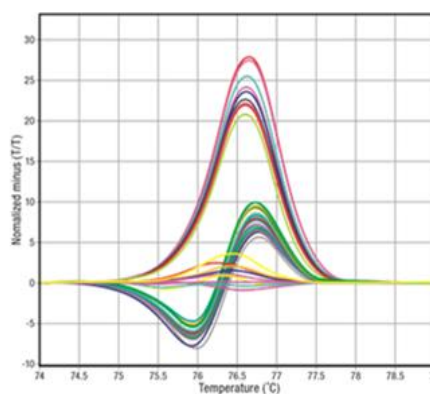


FIGURA 15 "B"

Fig. 15: Esempio di rappresentazione grafica delle curve di melting di diversi campioni in analisi.

I dati collezionati durante l'analisi HRM hanno un *range* di inizio (*pre-melt*) caratterizzato da diverse fluorescenze, le quali creeranno difficoltà ad analizzare correttamente i risultati nonostante siano visibili i differenti gruppi di genotipi. Le cause di una cattiva definizione dei cluster possono essere varie, a partire da piccole differenze di sequenza, qualità del campione, la lunghezza amplicone, problemi nella messa a punto e tipologia di reagenti utilizzati.

I possibili accorgimenti da prendere per migliorare l'elaborazione dei risultati possono essere:

- L'utilizzo di un controllo positivo per ogni *target*
- La diminuzione della dimensione dell'amplicone, in modo da aumentare l'influenza relativa di piccole differenze tra due sequenze
- La precisa normalizzazione della quantità di DNA di partenza

In altri casi, questa bassa definizione dei *cluster* può essere causata anche dalle coppie di *primer* utilizzate in quanto, il contenuto di GC di queste ultime può influenzare la temperatura di denaturazione del template. Garantire che il cambiamento di temperatura non sarà influenzato dalla sequenza del set di *primer* migliorerà il *clustering*, quindi l'unica soluzione attuabile per questo problema sarà progettare nuovi *primer* con meno contenuto in GC.

- Amplificazione insufficiente:

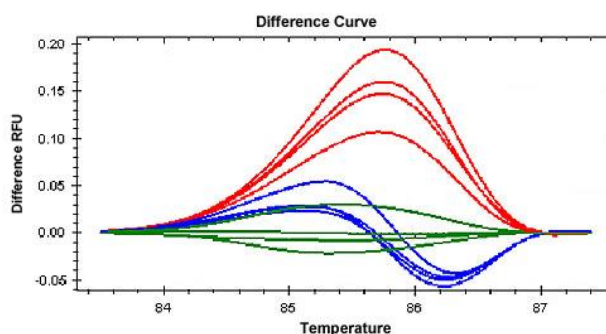


Fig: 16: Grafico delle differenze degli andamenti di fluorescenza (RFU, unità di fluorescenza relativa) ottenuta dopo una reazione di PCR con amplificazione insufficiente.

- Lunghezza dell'amplicone.

Di fondamentale importanza per le analisi delle curve di melting ad alta risoluzione è che l'intensità di fluorescenza alla fine del processo di amplificazione sia il quanto più possibile simile tra i vari campioni in analisi. Una delle principali cause è rappresentata dalla qualità del template di DNA, infatti un DNA di bassa qualità può impedire ai campioni di raggiungere il plateau e quindi influire negativamente sulla successiva analisi delle curve di dissociazione.

Una soluzione attuabile può essere quella di migliorare il sistema di estrazione e calibrare la fase di set-up della metodica agendo sulle quantità dei reagenti e sul numero di cicli (Fig. 17).

Anche la lunghezza dell'amplicone può costituire un elemento di disturbo. Nel caso in cui sia troppo lungo, l'influenza relativa delle mutazioni "interessanti" viene mascherata dalla variabilità caratteristica della sequenza analizzata. Analizzando infatti brevi ampliconi risulterà più facile la discriminazione tra genotipi differenti, per cui ove possibile è bene utilizzare amplificati con una lunghezza inferiore di 100 pb e, in ogni caso, mai superiori alle 300pb.

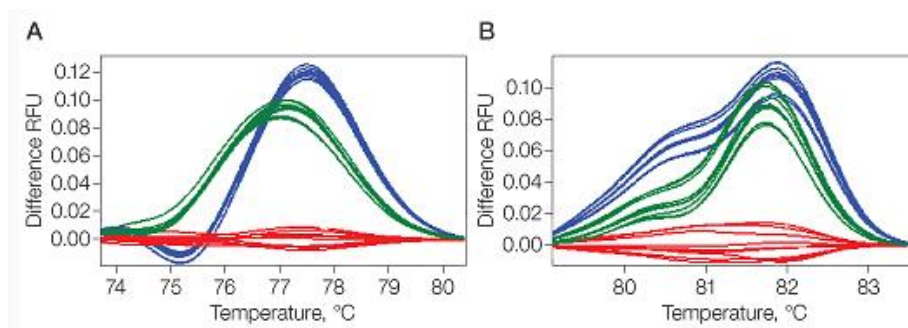


Fig. 17: Effetto della dimensione dell'amplicone sulle curve di Melting

In Figura 17 è rappresentato un confronto tra le differenze delle curve di fusione di due amplicati diversi, rispettivamente di 50 bp (Fig. 17A) e 100 bp (Fig. 17B). Risulta evidente come nel primo caso il *clustering* è nettamente migliore rispetto al secondo.

1.6. VALIDAZIONE DEI METODI DI PROVA

Il processo di validazione viene regolamentato da norme specifiche, in particolare la UNI CEI EN ISO/IEC 17025 definisce in maniera specifica i parametri necessari per considerare un metodo validato.

In questo documento viene descritto il termine validazione come "[...] conferma attraverso esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti".

Il processo atto a dimostrare l'affidabilità e la robustezza del metodo di prova si può suddividere in due fasi, fase analitica o preclinica e fase diagnostica o clinica.

Di seguito vengono descritti i parametri necessari alla valutazione oggettiva del metodo in esame.

Al fine di comprendere meglio i termini utilizzati è necessario riportare le definizioni secondo norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 di tali parametri:

- ✓ Accuratezza: scostamento tra il risultato di una prova ed il valore di riferimento convenuto.
- ✓ Precisione: grado di concordanza di una serie di risultati indipendenti ottenuti sugli stessi campioni in condizioni prestabilite.
- ✓ Ripetibilità: definisce il grado di concordanza tra replicati testati nella stessa seduta analitica (*within run*) o in sedute differenti (*between days*).
- ✓ Riproducibilità: definisce la capacità del metodo di fornire risultati consistenti quando applicato ad aliquote dello stesso campione testato in laboratori differenti che utilizzano lo stesso protocollo.
- ✓ Sensibilità analitica o LoD (*Limit of Detection*): definisce la più piccola quantità di analita rilevato dal metodo. Per la PCR, l'analita può essere espresso in valore di Ct, copie genomiche, copie geniche, dosi infettanti, unità formanti placca o colonia (pfu o cfu rispettivamente). Si calcola facendo diluizioni seriali dell'analita e testando tali diluizioni in triplicato.
- ✓ Sensibilità diagnostica (D-SN): proporzione di soggetti sicuramente infetti (nel caso di agenti infettivi) che risultano positivi al test. Lo stato del soggetto può essere determinato utilizzando comparazioni con altri test (*reference standard*). In quest'ultimo caso si parlerà più appropriatamente di sensibilità relativa.

2. SCOPO

Obiettivo di questo lavoro è lo sviluppo di metodi diagnostici rapidi ed efficaci per lo studio delle frodi di sostituzione di specie nel settore ittico.

A livello nazionale, il notevole e costante incremento dell'importazione di prodotto ittico destinato al consumo umano ha come conseguenza un aumento del livello di rischio di frodi per sostituzione di specie. In particolar modo le azioni di sorveglianza risultano problematiche qualora vi sia l'introduzione di specie poco studiate e difficilmente identificabile mediante indagine morfologica, soprattutto nel caso in cui il prodotto venga importato già lavorato.

Questo scenario ha portato ad un sensibile incremento nelle richieste di analisi dedicate all'identificazione di specie da parte degli enti preposti al controllo (NAS, capitanerie di porto, PIF, ecc). Il metodo Barcoding viene usualmente proposto come sistema di monitoraggio efficace e quale possibile metodo di riferimento (*gold standard*), tuttavia altri metodi alternativi sono stati studiati per ovviare alcune problematiche legate al sequenziamento o alla natura dei campioni in esame.

La presente tesi di dottorato è stata suddivisa in tre casi di studio sulla base delle metodiche utilizzate.

Per ovviare alcuni inconvenienti dovuti all'utilizzo di database pubblici e per fornire uno strumento robusto che possa essere un riferimento a livello nazionale per i diversi laboratori che abbiano la necessità di effettuare questo tipo di analisi, è stato creato un database locale biologico e di sequenze.

L'attività di sorveglianza condotta sul territorio nazionale ha permesso di valutare la fenomenologia delle frodi maggiormente riscontrate e la tipologia di prodotti coinvolti.

Il secondo caso di studio ha riguardato lo sviluppo di una metodica di PCR Real-Time per l'identificazione della specie *Octopus vulgaris*.

La recente introduzione di specie considerate "esotiche" nei mercati nazionali ha portato ad una richiesta notevole e costante di analisi dedicate all'identificazione dei molluschi cefalopodi. In particolare, nel caso della famiglia degli *Octopodidae*, *Octopus vulgaris* risulta la specie di maggior valore economico.

Si è voluta quindi sviluppare una metodica di Real-Time PCR alternativa al Barcoding, al fine di fornire una risposta analitica rapida ed economica per la conferma di specie *Octopus vulgaris*, applicabile ai campioni comunemente reperiti in commercio.

Terzo caso di studio ha visto come oggetto l'utilizzo dell'analisi ad alta risoluzione delle curve di melting (HRMA), per la discriminazione delle specie appartenenti al genere *Thunnus*.

Il genere in esame presenta una scarsa variabilità intraspecifica e, per tale motivo, la metodica del Barcoding risulta scarsamente discriminante. Si rende quindi necessario lo sviluppo di metodi sensibili, basati su singoli polimorfismi atti a caratterizzare efficacemente le specie considerate.

3. CASI DI STUDIO – Barcoding

3.1. INTRODUZIONE BARCODING APPLICATO ALLE FRODI NEL SETTORE ITTICO

Il metodo del Barcoding, i cui principi base sono descritti al capitolo 1.5.2.3, ha come obiettivo finale l'ottenimento di una sequenza di circa 650 paia di basi appartenente al gene codificante per la Citocromo Ossidasi I.

Il confronto delle sequenze ottenute mediante amplificazione in PCR end-point avviene mediante è uno strumento bioinformatico, BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) che si basa su di un algoritmo che permette allineare sequenze di DNA, cDNA e proteine fornendo una percentuale di identità della sequenza incognita (*query*) con quelle presenti nel database interrogato^[30]. I due database più comunemente utilizzati sono GenBank e BOLD.

GenBank è un database di sequenze nucleotidiche. Questo database fa parte dell'*International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, che comprende il DNA DataBank of Japan (DDBJ), e l'*European Molecular Biology Laboratory* (EMBL). Queste tre organizzazioni costituiscono una rete di interscambio di dati tra di loro da tutto il mondo permettendo a chi utilizza queste piattaforme di avere a disposizione dati aggiornati.

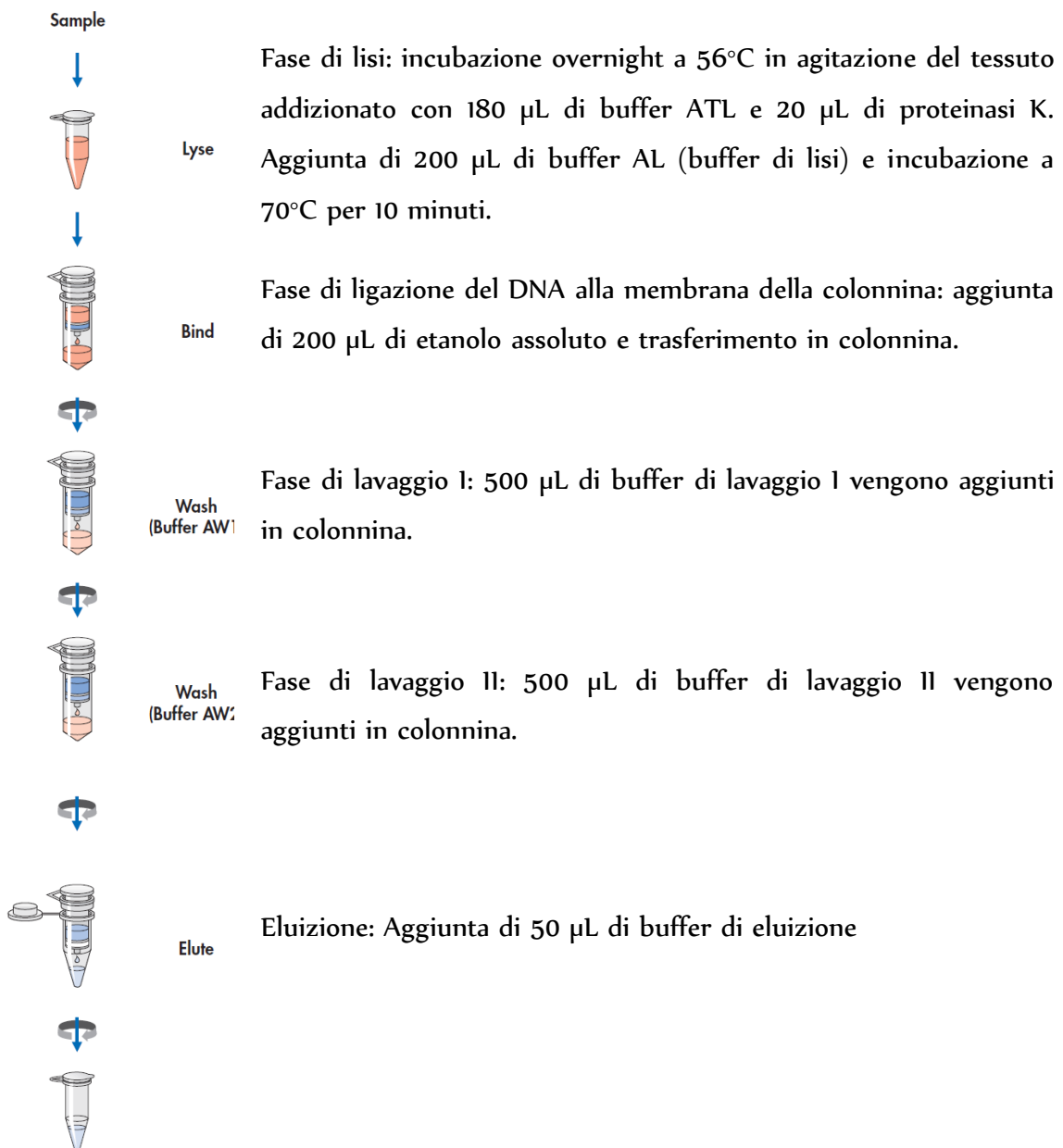
BOLD (Barcode of Life Data System) è un database a libero accesso preposto al deposito, all'analisi e alla pubblicazione di risultati di analisi di Barcoding. È il risultato di un progetto internazionale, "Barcode of Life" (BOL) che ha come obiettivo la creazione di un dataset di sequenze per tutte le specie esistenti, suddivise per Regni e con target geni differenti. Mettendo insieme dati molecolari, morfologici e di distribuzione delle varie specie colma una lacuna della bioinformatica^[31], creando un database dedicato e specifico diversamente da GenBank® in cui viene depositata qualsiasi tipo di sequenza. Un settore specifico del progetto BOL, denominato FishBOL si occupa in particolare dell'implementazione del database per quanto riguarda le specie ittiche. Ad oggi BOLD contiene le sequenze di oltre 100000 esemplari, per un totale di quasi 11000 specie ittiche studiate. Altro importante progetto internazionale, LabelFish (www.labelfish.eu), è nato con l'intento di monitorare il fenomeno delle frodi ittiche e standardizzare le metodologie diagnostiche per la tracciabilità e l'identificazione di specie nell'area atlantica.

3.2. MATERIALI E METODI – Barcoding

La metodica Barcoding è stata utilizzata come metodo di riferimento per tutti i campioni analizzati.

Il DNA genomico totale è stato estratto mediante kit commerciale QiaAmp DNA minikit (QIAGEN), a partire da 0.5g di tessuto muscolare fresco, congelato o conservato in etanolo 70-100% seguendo la procedura descritta dalla ditta:

QIAamp Spin Procedure



Gli estratti sono stati poi sottoposti ad amplificazione mediante PCR utilizzando la mix di reazione descritta in Tab. 4, con il profilo termico descritto in Tab. 5 e utilizzando il set di primer COIFishF1 e COIFishR1^[39] (Tab. 6). Tutte le reazioni sono state condotte utilizzando il termociclatore GeneAmp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystem).

Mix PCR per amplificazione del gene mitocondriale COI (Citocromo Ossidasi I)			
Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume X1 (µL)
Acqua MGB			31,75
Buffer	10X	1X	5
MgCl ₂	50mM	2,5mM	2,5
dNTPs mix	10mM	1mM	5
Primer: COIfishF1	100µM	0,5µM	0,25
Primer: COIfishR1	100µM	0,5µM	0,25
Taq polimerase	5U/µL	0,025U/µL	0,25
VOLUME TOTALE MIX			45
VOLUME DI DNA			5
VOLUME TOTALE DI REAZIONE			50

Tab. 4: Mix di PCR per l'amplificazione del gene Citocromo ossidasi subunità I.

Profilo termico PCR per amplificazione del gene mitocondriale COI (Citocromo Ossidasi I)			
N° di cicli	Fase	Temperatura	Tempo
1	Attivazione polimerasi	94°C	30 secondi
35	Denaturazione	94°C	30 secondi
	Annealing	52°C	30 secondi
	Estensione	72°C	1 minuto
1	Estensione finale	72°C	10 minuti
1	Refrigerazione	4°C	infinito

Tab. 5: Profilo termico utilizzato per l'amplificazione del gene Citocromo Ossidasi subunità I.

Primer utilizzati per l'amplificazione del gene mitocondriale COI (Citocromo Ossidasi I)		
Nome dei primer	Sequenza	Tm
COIfishF1	5'-TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCAC-3' (26)	59,3°C
COIfishR1	3'-ACTTCYGGGTGCCRAARAATCA-5' (23)	60,6°C

Tab. 6: Caratteristiche dei primer per l'amplificazione del gene Citocromo Ossidasi subunità I.

Una volta amplificato il tratto di interesse e verificata l'avvenuta amplificazione tramite una corsa elettroforetica in gel di agarosio all' 1% addizionato con bromuro d'etidio a 4 Volt/cm per 35 minuti, gli amplificati sono stati sequenziati presso il laboratorio diagnostica innovativa (U.O. Sequenziamento genetico e bioinformatica) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie mediante sequenziamento Sanger.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti nei database pubblici BOLD e GenBank.

3.3. MATERIALI E METODI – ittiobase

Al fine di creare uno strumento utile e funzionale per routinarie analisi di Barcoding (es. eseguite da laboratori di analisi pubblici o privati), e che fornisca informazioni di carattere generale riguardanti la nomenclatura, la distribuzione, le caratteristiche commerciali, eventuali rischi sanitari collegati al consumo o le possibili specie con cui un prodotto può essere sostituito, è stato ideato un sito web open source (Fig. 18).

All'interno del sito è stato costituito un database di sequenze ottenute mediante l'analisi Barcoding a partire da singoli esemplari interi, georeferenziati a livello di macroaree FAO e identificati morfologicamente mediante chiavi FAO.

Per ogni specie in esame sono stati analizzati almeno 10 esemplari in maniera tale da avere una misura, seppur del tutto indicativa, della variabilità intraspecifica.

In parallelo alla banca dati di sequenze è stata costituita una banca dati biologica, catalogando gli esemplari analizzati e conservando frammenti di tessuto muscolare in etanolo al 70%.

A fine 2013 è stato organizzato un ring-trial al fine di dare robustezza alla banca dati costituita e al contempo verificare la riproducibilità inter-laboratorio del metodo. Sono stati coinvolti 8 laboratori operanti nell'ambito dell'identificazione di specie, comprendendo Università e Istituti Zooprofilattici.

A ciascuno dei partecipanti sono stati inviati 10 frammenti di circa 0.5 grammi di tessuto muscolare in etanolo 70% prelevati dalla banca dati biologica e ne è stata richiesta l'identificazione mediante l'utilizzo della metodica del Barcoding.

È stato fornito a tutti i partecipanti la procedura descritta al paragrafo 3.2, lasciando libertà di scelta per quanto riguarda l'utilizzo la tipologia di termociclatore in quanto ritenuto ininfluenza per l'esito del test.

È stata poi condotta un'analisi statistica dei dati al fine di poter valutare l'andamento del ring trial.

Per la valutazione della concordanza tra laboratori si è proceduto al calcolo dell'indice K di Cohen^[32].

E' stato valutato il grado di concordanza tra il risultato atteso e quello fornito dai laboratori a livello di genere, specie e genere + specie.

Il valore del coefficiente K di Cohen, è una misura dell'accordo (*Coefficient of agreement*) tra risposte qualitative fornite da differenti classificatori (Laboratori) che valutano lo stesso

set di campioni; in altri termini, viene determinata la significatività dell'accordo rispetto alle attese.

Le analisi sono state effettuate mediante software SAS (SAS 9.3, Institute Inc., Cary NC) impiegando nel particolare la FREQ Procedure^[33]. A scopo interpretativo, si suggerisce l'utilizzo della scala di Landis & Koch^[34] così strutturata:

K	Concordanza
0	Scarsissima
0.01-0.20	Scarsa
0.21-0.40	Discreta
0.41-0.60	Moderata
0.61-0.80	Buona
0.81-1.00	Ottima



Per ordine:

Per famiglia:

Per genere:

Per specie:

Cerca per parole chiave:
es.: nome italiano, nome latino ecc...

includi corrispondenze parziali

Classificazione tassonomica | Nomi Comuni | Traccati IEF | Sequenze | Distribuzione | Caratteristiche commerciali | Sicurezza e Frode

Engraulis encrasicolus

- Acciuga, Alicia
- European Anchovy
- Anchoa, Anchoa Commun
- Anchovis, Sardelle
- Anchoa, Bocarte, Boqueron
- Ancho, European Anchov
- Anchois
- Anjos
- Biquetrio

Classificazione tassonomica | Nomi Comuni | Traccati IEF | Sequenze | Distribuzione | Caratteristiche commerciali | Sicurezza e Frode

Engraulis encrasicolus (Linnaeus 1758)

Ordine: Clupeiformes
Famiglia: Engraulidae
Genere: Engraulis
Alfa: AEE

Sinonimi:
Lunghezza massima: 20 cm

Acciuga, Alicia

Specie inserita nel Decreto MIPAAF con denominazione obbligatoria.
Il nome di specie encrasicolus, deriva dal greco en = dentro, chole = bile e kra = testa, a significare il sapore amaro, quando viene consumata cruda.

Classificazione tassonomica | Nomi Comuni | Traccati IEF | Sequenze | Distribuzione | Caratteristiche commerciali | Sicurezza e Frode

Engraulis encrasicolus

Valore del pI delle bande significative di Engraulis encrasicolus a diversi intervalli di pH:

8.15-pH-9.50: 8.43
6.55-pH-8.14: 6.70, 6.78, 6.89, 7.11, 7.21
5.20-pH-6.54: 5.74, 5.85, 5.91
3.50-pH-5.19: 4.93

Esempio di tracciata con pI elaborati dal software

Classificazione tassonomica | Nomi Comuni | Traccati IEF | Sequenze | Distribuzione | Caratteristiche commerciali | Sicurezza e Frode

Engraulis encrasicolus

Sequenza 1 di 12

Sequenza:

Original:
Primer Forward: CCGTDFI (5'-TGACATATGCTAAAGATATTGGCAC-3')
Primer Reverse: CCGSHEI (5'-ACTTCGGGTGRCRBAARATCA-3')

Sequenza:
(+5)
CTATATCTTTTGGTGTCTGAGAGAGATGTGGAGAGACACTAGCTCTTTCTTGGAGAGACTAGCCAAAC
AGAGACTCTCGGGGGGCGATCAAAATTTATAGTATGTTACTCTAGCGATCCGATATATCTTTCTATGTA
TGCCATCTTAACTGGTGGTGGGAAATTTGATTTCTCTCTATATAGGGGCCAGACATGCGATCCCGGAATG
AGCATATGAGCTTTGACT
AGATGAKAGTCTACCCCTTTATAGGAACTCTCCACAGAGAGCTGATGATTTAACTCTCTCTCTCTCT
ACTTGGAGGATTTCTATCTCTAGTGTCTATTCTACTACTATTATTATTAAGAGCCTCTATTCTCA
CATCTAGAGAGCTCTTTCTTGGCTTATATAGAGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGGATCTATCTCTCTCAAGACCAACTAATATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
ATCAGACCTATTTC

Classificazione tassonomica | Nomi Comuni | Traccati IEF | Sequenze | Distribuzione | Caratteristiche commerciali | Sicurezza e Frode

Engraulis encrasicolus

Caratteristiche delle carni: Carni saporite, piuttosto grasse e deperibili ricche di acidi grassi insaturi.

Taglia minima di pesca: 9 cm (Reg. CE 1967/2006 del 21/12/2006). Gli stati membri possono convertire la taglia minima in 110 esemplari per Kg. Per la pesca fuori dal Mediterraneo la taglia minima è di 10 cm (Reg. CE 950/1996).

Tipologie commerciali: Viene commercializzata fresca, congelata, come conserva all'olio, marinata cruda, salata e salata all'olio in filetti o pasta. Un derivato della lavorazione di alici prodotto in Sud Italia è la "colatura di alici", liquido derivato della produzione di acciughe salate e utilizzato in cucina come condimento.

Classificazione tassonomica | Nomi Comuni | Traccati IEF | Sequenze | Distribuzione | Caratteristiche commerciali | Sicurezza e Frode

Engraulis encrasicolus

Classificazione tassonomica | Nomi Comuni | Traccati IEF | Sequenze | Distribuzione | Caratteristiche commerciali | Sicurezza e Frode

Engraulis encrasicolus

Frode di sostituzione:

L'acciuga salata sott'olio in filetti può essere confusa con l'alicia (Sardinella aurita) di minor pregio commerciale e distinguibile con tecniche di biologia molecolare. A volte tale tipo di frode ha spinto alcuni produttori a deconseguare fraudolentemente la dicitura "alicia atlantica" in "alicia atlantica", errore più simile ad altri. Più facile la distinzione tra acciuga e alicia fresca in quanto quest'ultima ha una caratteristica sorta dorata sui fianchi, da cui il nome S. aurita.

Note di sicurezza alimentare:

La famiglia degli engraulidi, a cui appartiene l'acciuga è inserita nel Reg. CE 2073/2005 quale specie a rischio per la presenza di istamina per l'elevato contenuto naturale di istidina. L'ammontato presente nell'istamina. Pertanto va lavorata e consumata fresca per evitare che la concentrazione di istamina superi i valori massimi consentiti dalla normativa, pari ad un tenore medio max. di 100 mg/kg che può essere elevato a 200 mg/kg in certe sottospesie a maturazione enzimatica (alicia). L'acciuga è anche specie sensibile all'Zoonosi, nonostante che può rimanere vitale attorno ai ricorsi e nelle carni e che se ingerito dall'uomo può provocare lesioni gastro-intestinali anche gravi. Per questo motivo, secondo il "vademecum Igiene IEF" (Reg. CE n.853 e n.854/2004) pesci come l'acciuga non vanno consumati crudi ma solo cotti, salati o marcati con sistemi di salamoia sufficienti a de-istalizzare il parassita. Il valore limite di Caduto è pari a 0.30 ppm (Reg. CE 853/2005). Vedi il Reg. CEE n. 2406 del 26/11/96 riguardo i parametri di freschezza del prodotto.

Fig. 18: informazioni contenute nel sito web creato. L'esempio riporta la scheda di *Engraulis encrasicolus* (Fonte: www.ittiobase.it)

3.4. MATERIALI E METODI – Attività di sorveglianza

Durante tutto il periodo di Dottorato, sono stati collezionati i campioni necessari ad effettuare una sorveglianza sui prodotti venduti in tutto il territorio nazionale per un totale di 875 campioni.

Si tratta di campioni pervenuti all'Istituto Zooprofilattico sia da enti pubblici (NAS, Capitanerie di porto, PIF, Asl ecc) che privati (grossisti, GDO, importatori).

L'identificazione dei campioni è avvenuta tramite l'analisi Barcoding e, quando possibile, mediante chiavi dicotomiche FAO.

La numerosità dei campioni studiati ha permesso di valutare l'andamento in termini percentuali delle frodi, permettendo una comparazione dei valori riscontrati con quelli citati in letteratura.

È stato inoltre possibile estrapolare le percentuali relative di alcune categorie di prodotti ittici mostrando quali sono i prodotti maggiormente oggetto di frode e in che percentuale.

3.5. RISULTATI E DISCUSSIONE

- *Ittiobase e ring test*

Ad oggi sono state studiate 40 specie per un totale di più di 400 sequenze inserite all'interno del database creato e disponibili alla consultazione (Tab. 7). Di tutti gli esemplari sono stati raccolte le informazioni descritte sopra, sono state create le schede informative e tutti i dati sono stati utilizzati per popolare il database il quale subirà nel prossimo futuro un'implementazione notevole, visto il recente coinvolgimento nel progetto di altri enti di ricerca che potranno fornire un contributo notevole creando così uno strumento, unico a livello nazionale e internazionale per completezza e tipologia di informazioni che lo popolano.

<i>Alosa fallax lacustris</i>	<i>Pagellus erythrinus</i>
<i>Anguilla anguilla</i>	<i>Platichthys flesus italicus</i>
<i>Arnoglossus laterna</i>	<i>Pleuronectes platessa</i>
<i>Auxis rochei</i>	<i>Pseudopeneus prayensis</i>
<i>Boops boops</i>	<i>Salvelinus alpinus</i>
<i>Cepola macrophthalma</i>	<i>Sardina pilchardus</i>
<i>Clupea harengus</i>	<i>Scomber scombrus</i>
<i>Diplodus annularis</i>	<i>Solea lascaris</i>
<i>Engraulis encrasicolus</i>	<i>Solea vulgaris</i>
<i>Euthynnus alletteratus</i>	<i>Sparus aurata</i>
<i>Gobius niger</i>	<i>Sphyræna sphyræna</i>
<i>Lepidopus caudatus</i>	<i>Squilla mantis</i>
<i>Lithognathus mormyrus</i>	<i>Thunnus alalunga</i>
<i>Liza ramada</i>	<i>Thunnus thynnus</i>
<i>Merlangius merlangus</i>	<i>Thymallus thymallus</i>
<i>Merluccius merluccius</i>	<i>Tinca tinca</i>
<i>Microstomus kitt</i>	<i>Trachurus mediterraneus</i>
<i>Mullus barbatus</i>	<i>Trigla lucerna</i>
<i>Mustelus punctulatus</i>	<i>Umbrina cirrosa</i>
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Xiphias gladius</i>

Tab. 7: elenco delle 40 specie che popolano ad oggi il sito web ITTIODATABASE

L'applicazione routinaria del Barcoding è stata inoltre verificata mediante l'uso di un circuito inter-laboratorio al fine di definire i criteri di ripetibilità e robustezza della tecnica proposta. La Tab. 8 riporta nel dettaglio tutti gli esiti rilasciati dai laboratori partecipanti.

ID	ESITO ATTESO	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 8	LAB 10
1	<u>Sparus aurata</u> (Orata)	<u>Sparus aurata</u> (Orata)	<u>Sparus aurata</u> (Orata)	<u>Sparus aurata</u> (Orata)	<u>Sparus aurata</u> (Orata)	<u>Sparus aurata</u> (Orata)	<u>Sparus aurata</u> (Orata)	<u>Sparus aurata</u> (Orata)	<u>Sparus aurata</u> (Orata)
2	<u>Amoglossus laterna</u> (Zanchetta o Suacia)	<u>Amoglossus laterna</u> (Suacia)	<u>Amoglossus laterna</u> (Zanchetta o Suacia)	<u>Amoglossus laterna</u> (Suacia)	<u>Amoglossus laterna</u> (Zanchetta o Suacia)	<u>Amoglossus laterna</u> (Suacia)	<u>Amoglossus imperialis</u> (Zanchetta o Suacia imperiale)	<u>Amoglossus laterna</u> (Zanchetta o Suacia)	<u>Amoglossus laterna</u> (Zanchetta o Suacia)
3	<u>Pleuronectes platessa</u> (Platessa)	<u>Pleuronectes platessa</u> (Platessa)	<u>Pleuronectes platessa</u> (Platessa)	<u>Pleuronectes platessa</u> (Platessa)	<u>Pleuronectes platessa</u> (Platessa)	<u>Pleuronectes platessa</u> (Platessa)	<u>Pleuronectes platessa</u> (Platessa) o <u>Pleuronectes quadrituberculatus</u> (Platessa del Pacifico)	<u>Pleuronectes platessa</u> (Platessa)	<u>Pleuronectes platessa</u> (Platessa)
4	<u>Microstomus kitt</u> (Limanda)	<u>Microstomus kitt</u> (Sogliola limanda)	<u>Microstomus kitt</u> (Limanda)	<u>Microstomus kitt</u> (Sogliola)	<u>Microstomus kitt</u> (Limanda)	<u>Microstomus kitt</u> (Limanda-Sogliola)	<u>Microstomus kitt</u> (Limanda)	<u>Microstomus kitt</u> (Sogliola o Limanda)	<u>Microstomus kitt</u> (Limanda)
5	<u>Pagellus erythrinus</u> (Pagello fragolino)	<u>Pagellus erythrinus</u> (Pagello fragolino)	<u>Pagellus erythrinus</u> (Pagello fragolino)	<u>Pagellus erythrinus</u> (Pagello fragolino)	<u>Pagellus erythrinus</u> (Pagello fragolino)	<u>Pagellus erythrinus</u> (Pagello fragolino)	<u>Pagellus erythrinus</u> (Pagello o Fragolino)	<u>Pagellus erythrinus</u> (Pagello fragolino o Fragolino)	<u>Pagellus erythrinus</u> (Pagello fragolino)
6	<u>Umbrina cirrosa</u> (Ombrina)	<u>Umbrina cirrosa</u> (Ombrina)	<u>Umbrina cirrosa</u> (Ombrina)	<u>Umbrina cirrosa</u> (Ombrina)	<u>Umbrina cirrosa</u> (Ombrina)	<u>Umbrina cirrosa</u> (Ombrina)	<u>Umbrina cirrosa</u> (Ombrina)	<u>Umbrina cirrosa</u> (Ombrina)	<u>Umbrina cirrosa</u> (Ombrina)
7	<u>Mullus barbatus</u> (Triglia di fango)	<u>Mullus barbatus</u> (Triglia di fango)	<u>Mullus barbatus</u> (Triglia di fango)	<u>Mullus barbatus</u> (Triglia di fango)	<u>Mullus barbatus</u> (Triglia di fango)	<u>Mullus barbatus</u> (Triglia di fango)	<u>Mullus barbatus</u> (Triglia)	<u>Mullus barbatus</u> (Triglia di fango)	<u>Mullus barbatus</u> (Triglia di fango)
8	<u>Boops boops</u> (Boga)	<u>Oblada melanura</u> (Occhiata)	<u>Boops boops</u> (Boga)	<u>Boops boops</u> (Boga)	<u>Boops boops</u> (Boga)	<u>Boops boops</u> (Boga)	<u>Boops boops</u> (Boga)	<u>Boops boops</u> (Boga)	<u>Boops boops</u> (Boga)
9	<u>Cepola macrophthalmia</u> (Cepola)	<u>Cepola macrophthalmia</u> a* (Bandiera rossa)	<u>Cepola macrophthalmia</u> a* (Cepola)	<u>Cepola macrophthalmia</u> a* (Bandiera rossa)	<u>Cepola macrophthalmia</u> a* (Cepola)	<u>Cepola macrophthalmia</u> a* (Bandiera rossa)	<u>Cepola macrophthalmia</u> a* (Cepola)	<u>Cepola macrophthalmia</u> a* (Bandiera rossa)	<u>Cepola macrophthalmia</u> (Cepola)
10	<u>Clupea harengus</u> (Aringa)	<u>Clupea harengus</u> (Aringa)	<u>Clupea harengus</u> (Aringa)	Non identificato	<u>Clupea harengus</u> (Aringa)	<u>Clupea harengus</u> (Aringa)	<u>Clupea harengus</u> (Aringa)	<u>Clupea harengus</u> (Aringa)	<u>Clupea harengus</u> (Aringa)

Tab. 8: risultati ring-trial:

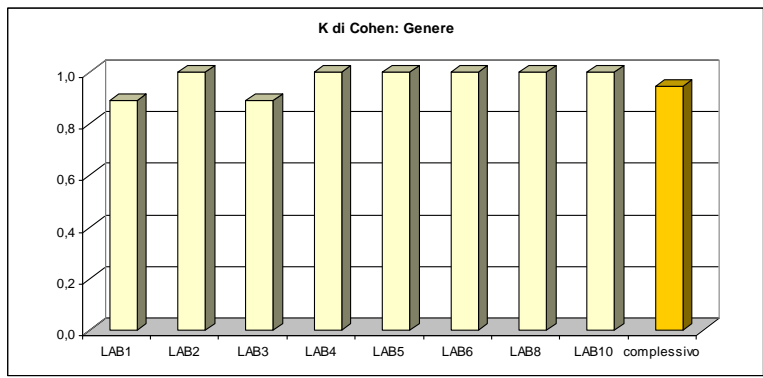
in rosso vengono evidenziati i risultati non corretti;

in blu vengono evidenziati i casi in cui il nome comune attribuito al campione non risulta conforme al decreto di riferimento per la corretta nomenclatura sul territorio nazionale: D.M. MiPAAF del 31 gennaio 2008 (G.U. n. 45 del 22/02/2008) e succ. integr. fino al D.M. del 19 novembre 2012 (G.U. n. 27 del 1 febbraio 2013).

(*): cepola: secondo D.M MiPAAF = *Cepola macrophthalmia*, secondo Fishbase = *Cepola macrophthalmia*

La valutazione della Kappa di Cohen (K) ha permesso stimare la concordanza tra risultati ottenuti da ciascun laboratorio e i risultati attesi nonché di effettuare una valutazione complessiva delle performance del circuito.

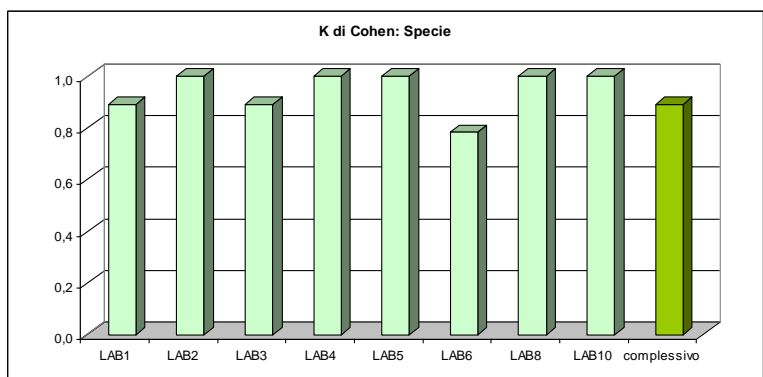
Si è deciso di suddividere le risposte in funzione del genere (Graf. 1), della sola specie (Graf. 2) e del genere + specie (Graf. 3) al fine di valutare in modo complessivo le attribuzioni fornite dai laboratori ed evidenziare eventuali criticità di interpretazione.



Graf. 1: rappresentazione grafica dei valori di K di Cohen relativi al solo genere fornito dai laboratori partecipanti al ring test

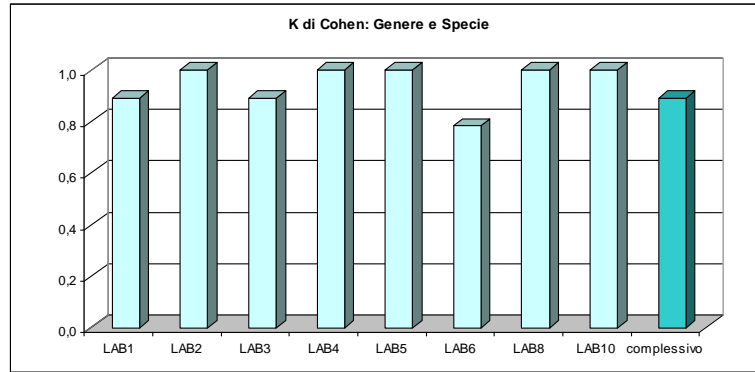
Tutti i laboratori mostrano un'ottima concordanza con il risultato atteso nell'identificazione del genere.

La concordanza complessiva nell'identificazione del genere è ottima e non dovuta al caso ($p\text{-value} < 0,05$). Le performance complessive presentano una K pari a 0.94, evidenziando come l'attribuzione del genere mediante Barcoding non presenti difficoltà interpretative.



Graf. 2: rappresentazione grafica dei valori di K di Cohen relativi alla sola specie fornita dai laboratori partecipanti al ring test

Tutti gli altri laboratori mostrano un'ottima concordanza con il risultato atteso nell'identificazione della specie. Vi è una unica eccezione (laboratorio 6) nella quale si osserva concordanza buona/sostanziale. La concordanza complessiva nell'identificazione della specie è ottima e non dovuta al caso ($p\text{-value} < 0,05$). Il livello complessivo di concordanza viene influenzato dalla singola risposta e il valore è pari a 0,89.



Graf. 3: rappresentazione grafica dei valori di K di Cohen relativi a genere e specie fornito dai laboratori partecipanti al ring test

Il laboratorio 6 mostra una buona concordanza con il risultato atteso nell'identificazione del genere e della specie. Tutti gli altri laboratori mostrano un'ottima concordanza con il risultato atteso nell'identificazione del genere e della specie. La concordanza complessiva nell'identificazione del genere e della specie è ottima e non dovuta al caso ($p\text{-value} < 0,05$).

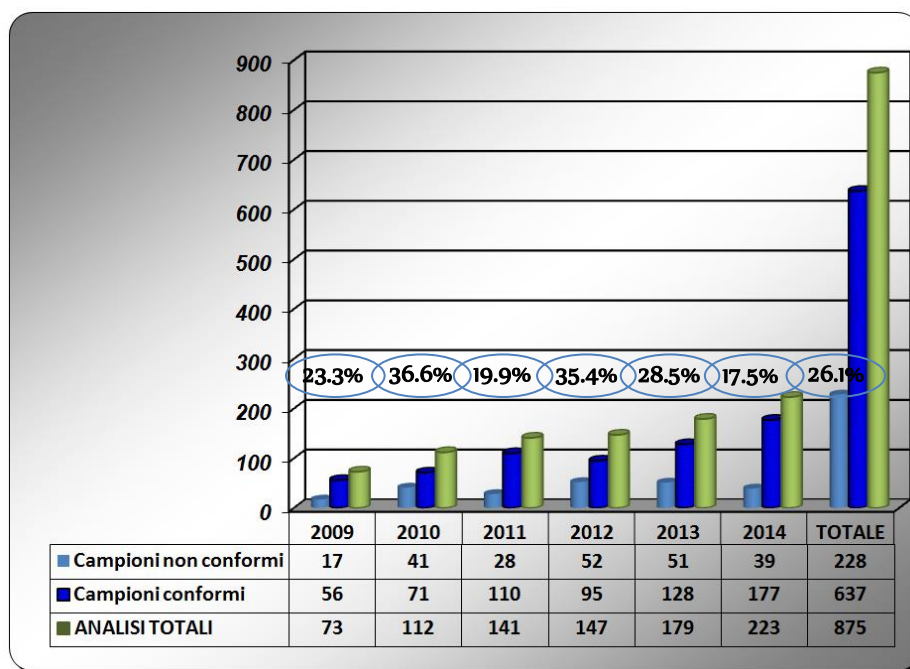
Gli esiti del ring test hanno evidenziato un sostanziale *agreement* tra laboratori partecipanti, sottolineando l'affidabilità del metodo Barcoding. Il ring test ha permesso di evidenziare tuttavia una problematica inerente l'interpretazione del dato e l'utilizzo di banche dati pubbliche. In particolare, allineando la sequenza di uno dei campioni sul Database GenBank, senza un'accurata valutazione dell'output fornito dal software, la sequenza con una percentuale di similarità pari al 100% risulta di una specie diversa da quella corretta. L'evidente errore di inserimento di tale sequenza ha causato l'emissione di un referto errato da parte del Lab 1, a dimostrazione della necessità di un database di sequenze di confronto verificato e dalla sicura attribuzione morfologica/genetica.

Inoltre, come mostrato in tabella 5, vi sono delle discrepanze a livello di denominazione italiana dei prodotti esaminati che non viene riportata secondo quanto stabilito da decreto M.I.P.A.A.F del 31 gennaio 2008 e successive integrazioni. Questo evidenzia la necessità di una opportuna formazione del personale addetto alle analisi di laboratorio ed alla refertazione anche in merito alla normativa vigente.

- *sorveglianza*

La sorveglianza condotta dal 2009 al 2014 (Graf. 4) ha permesso di estrapolare dati interessanti riguardanti la situazione delle frodi per sostituzione di specie presente sui mercati nazionali.

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti, ponendo l'attenzione sulle percentuali medie di frodi riscontrate negli anni e sulle specie più frodate.



Graf. 4: grafico riassuntivo dei campioni analizzati dal 2009 al 2014 e relative percentuali di frodi riscontrate

Come si può notare nel grafico 4, l'attività di sorveglianza ha visto un continuo incremento negli anni, con 79 campioni analizzati nel 2009 e 223 nel 2014, per un totale di 875 casi.

Nonostante ciò, la percentuale di frode media resta pressoché costante nel tempo e si attesta attorno al 26.1%.

Come si può notare nel grafico 4, l'attività di sorveglianza ha subito un incremento costante negli anni, con 79 campioni analizzati nel 2009 e 223 nel 2014, per un totale di 875 casi.

Nonostante ciò, la percentuale di frode media resta pressoché costante nel tempo e si attesta attorno al 26.1%.

Dalla Fig. 19 si evince come negli specifici gruppi di prodotti ittici maggiormente rappresentati nel piano dei campionamenti (pesci piatti, cefalopodi, cernie, gadiformi), i livelli medi percentuali di frodi riscontrate risultano superiori alla media generica complessiva dei campioni considerati nel loro insieme. Nel particolare i raggruppamenti costituiti da cefalopodi, gadiformi, pesci piatti e cernie rappresentino il 73% dei campioni analizzati. Questi 4 gruppi hanno mostrato un livello di frode rispettivamente del 43%,40%, 13% e 74%

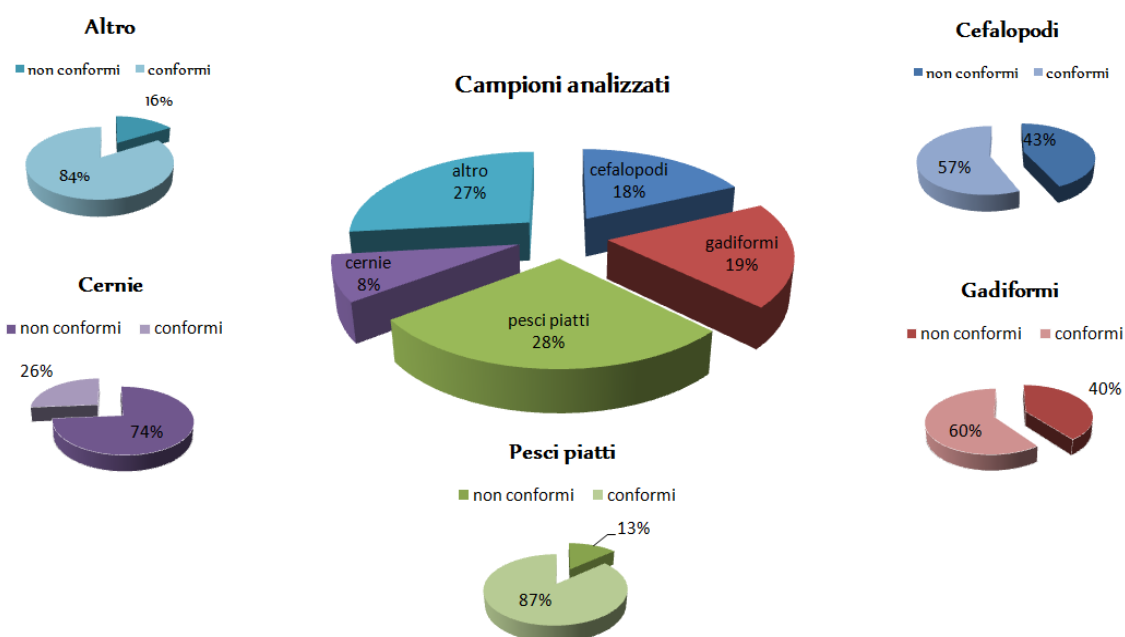


Figura 19: rappresentazione grafica dei campioni analizzati durante l'attività di sorveglianza. Nel grafico centrale sono riportate la numerosità percentuale dei campioni pervenuti, suddivisa nei 4 gruppi maggiormente rappresentati e un quinto gruppo denominato "altro". Per ogni gruppo è rappresentata, tramite i grafici laterali, la percentuale di frode riscontrata.

Durante i campionamenti sono state riscontrati alcuni casi di frode di sostituzione di specie aventi risvolti ambientali.

In particolare, un campione dichiarato *Carcharinus dussumieri* si è rivelato in realtà *Sphyrna lewini*, squaliforme incluso nell'appendice II della lista CITES, la quale include "specie non necessariamente in via di estinzione, ma il cui commercio deve essere controllato in modo da evitarne un utilizzo incompatibile con la sopravvivenza della specie" (www.cites.org).

Un altro caso di frode di sostituzione di specie con implicazioni ambientali è stato registrato in 3 campioni dichiarati come “tonno pinne gialle”, catturati in Mediterraneo e commercializzati sotto forma di pesce secco. L’analisi Barcoding a cui sono stati sottoposti i campioni ha permesso di identificare 2 esemplari di *Tursiops truncatus* e un esemplare di *Stenella coeruleoalba*, entrambi inserite ne nell’appendice II del CITES e, nel secondo caso, la cui cattura è vietata nell’areale di pesca mediterraneo dichiarato in etichetta.

4. CASI DI STUDIO – PCR Real Time

4.1. INTRODUZIONE – *Octopus vulgaris*

L'ordine degli *Octopoda* contiene due subordini: i *Cirrata* e gli *Incirrata*.

I *Cirrata* sono semigelatinosi e morbidi. Vivono nelle acque più profonde ed hanno un paio di pinne sul manto, una profonda membrana connettiva e file di papille sensoriali (cirri) adiacenti alle ventose. Questi polpi sono raramente catturati e a causa della loro carne troppo molle non hanno un valore economico.

Gli *Incirrata* includono i generi *Octopus* e *Amphioctopus*. Le varie specie appartenenti a questi generi si possono ritrovare in tutte le acque marine del mondo dai litorali alle fosse oceaniche più profonde. I polpi bentonici (famiglia *Octopodidae*) della piattaforma continentale sono i più ricercati per il commercio. Il rapporto annuale del 1995 della FAO sulla pesca ha riportato che sono stati pescate circa 247.600 tonnellate di polpi in tutto il mondo (circa il 10% dei cefalopodi pescati in totale). L'8% di questi (24.487 tonnellate) sono stati pescati nel Pacifico centro orientale. La maggior parte sono catturati per il consumo umano e sono venduti freschi, congelati o essiccati.

L'attribuzione di specie mediante le chiavi morfologiche è estremamente complicata dalla grandissima varietà di specie appartenenti a questa famiglia, con caratteristiche morfologiche molto simili tra loro e facilmente confondibili. Basti pensare che la maggior parte delle specie del Pacifico centro orientale (più di 40 specie) non ha ancora una descrizione formale o dettagli sulla biologia, la distribuzione o l'importanza commerciale^[35].

Lavori recenti di identificazione genetica di specie però hanno risolto diversi problemi tassonomici^[36,37]. Di seguito viene riportata la classificazione delle specie appartenenti al sottordine *Incirrata*, a cui appartengono i generi *Octopus* e *Amphioctopus* oggetto di questo studio (Appendice A).

Classificazione scientifica

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Regno	<i>Animalia</i>
Sottoregno	<i>Eumetazoa</i>
Ramo	<i>Bilateria</i>
Superphylum	<i>Protostomia</i>
(clade)	<i>Lophotrochozoa</i>
Phylum	<i>Mollusca</i>
Subphylum	<i>Conchifera</i>
Classe	<i>Cephalopoda</i>
Sottoclasse	<i>Coleoidea</i>
Superordine	<i>Octopodiformes</i>
Ordine	<i>Octopoda</i>
Sottordine	<i>Incirrata</i>
Famiglia	<i>Octopodidae</i>

La famiglia delle *Octopodidae* contiene 5 sottofamiglie:

- Sottofamiglia *Bathypolypodinae*
- Sottofamiglia *Eledoninae*
- Sottofamiglia *Graneledoninae*
- Sottofamiglia *Megaleledoninae*
- Sottofamiglia ***Octopodinae***

La produzione mondiale dei molluschi cefalopodi secondo dati del 2007 Ismea si attesta intorno alle 4.375.000 tonnellate su un totale di 140.393.000 tonnellate di produzione del pescato^[3].

Il cospicuo aumento del mercato mondiale di polpi porta inevitabilmente all'ingresso nella Comunità Europea di nuove specie che fino a qualche anno fa erano presenti solo nei mercati limitrofi alle aree di pesca.

Il prodotto maggiormente apprezzato dal consumatore europeo per quanto riguarda questo particolare prodotto è *Octopus vulgaris* e, conseguentemente, anche il valore commerciale è sensibilmente maggiore rispetto alle altre specie.

Per questo motivo, *Octopus vulgaris* è spesso oggetto di frodi per sostituzione con altre specie della famiglia degli *Octopodidae* di minor pregio. Questa frode non è di tipo sanitario in quanto non sono conosciute specie di polpi tossiche per l'uomo.

Il D.M. 31 gennaio 2008 elenca 11 specie di polpi con la propria denominazione commerciale.

La dicitura "Polpo" per il prodotto fresco o congelato sta ad indicare in modo univoco solo la specie *Octopus vulgaris*. Le caratteristiche di questa specie indicate nelle chiavi di identificazione FAO^[35] sono:

- taglia medio-grande, animale massiccio in apparenza,
- braccia robuste di uguale lunghezza e diametro, solo il I paio leggermente più corto,
- nei maschi il III paio di braccia è il più corto e finalizzato all'accoppiamento con una modificazione finale di una ligula a forma di cucchiaio (*spoon-shaped*) di solito lunga circa il 2,5% del tentacolo che la porta.
- dalle 7 alle 11 lamelle branchiali nella parte esterna di ogni branchia includendo la lamella terminale.

4.2. MATERIALI E METODI – PCR Real-Time applicata a *Octopus vulgaris*

4.2.1. Raccolta dei campioni di riferimento

Complessivamente sono stati raccolti 100 campioni congelati appartenenti ai generi *Octopus* e *Amphioctopus* durante tutto il periodo di Dottorato, selezionati sulla base alla tipologia di prodotto commercializzato (trasformati, lavorati, interi etc.). Per costruire la banca dati di riferimento si è preferito utilizzare campioni interi o eviscerati in maniera tale da poter effettuare un riconoscimento morfologico.

I campioni analizzati sono stati raccolti dai vari mercati ittici, supermercati e pescherie in ambito nazionale che conferiscono all'Istituto Zooprofilattico delle Venezie per l'analisi di identificazione di specie. I campioni sono stati fotografati e descritti grazie all'utilizzo delle chiavi tassonomiche FAO^[35] (Appendice A).

4.2.2. Identificazione molecolare

Tutti i campioni sono stati identificati sia tramite chiavi dicotomiche FAO (identificazione morfologica), che tramite analisi Barcoding (identificazione molecolare) come descritto al capitolo 3.2 in maniera tale da avere la certezza della specie oggetto di analisi e poter paragonare il metodo in PCR Real Time con i due metodi di riferimento

4.2.3. Il caso di *Octopus membranaceus*

Durante il lavoro preliminare di riconoscimento molecolare delle specie attraverso il Barcoding è stata evidenziata l'impossibilità di riconoscere gli esemplari appartenenti alla specie *Octopus membranaceus* attraverso questa metodica. Di questa specie sono presenti in GenBank solo 3 sequenze di Citocromo B (Accession number: FJ360563.1, FJ360564.1, FJ360565.1), un gene mitocondriale utilizzato comunemente assieme al gene COI per l'identificazione molecolare di specie^[38].

Alla luce di ciò è stato testato un set di primer universali per l'amplificazione del CytB^[38] (Tab. 9) e, utilizzando lo stesso profilo termico impiegato per l'amplificazione del gene COI (Tab. 5), si è cercato consolidare il risultato dell'analisi morfologica confermando l'appartenenza di otto campioni alla specie *O. membranaceus*.

Il profilo termico utilizzato per l'amplificazione è riportato in Tab. 12

Profilo termico PCR per amplificazione del gene mitocondriale CytB (Citocromo B) di <i>O. membranaceus</i>			
N° di cicli	Fase	Temperatura	Tempo
1	Attivazione polimerasi	94°C	30 secondi
40	Denaturazione	94°C	30 secondi
	Annealing	60°C	30 secondi
	Estensione	72°C	1 minuto
1	Estensione finale	72°C	10 minuti
1	Refrigerazione	4°C	infinito

Tab. 12: Profilo termico utilizzato per l'amplificazione del gene Citocromo B di *O. membranaceus* con i primer CytB_membra_For e CytB_membra_Rev.

4.2.4. Messa a punto della metodica molecolare di riconoscimento

Per discriminare rapidamente *O. vulgaris* dalle altre specie di cefalopodi appartenenti alla famiglia *Octopodidae* si è deciso di utilizzare una metodica che prevedesse l'uso della PCR Real Time per le sue caratteristiche peculiari di robustezza, rapidità ed economicità che la rendono molto vantaggiosa se utilizzata in laboratori di analisi.

Il disegno di primer è stato fatto su di un allineamento di sequenze consenso del gene Citocromo Ossidasi I ottenute attraverso l'allineamento e il confronto di tutte le sequenze di COI presenti in GenBank di varie specie di *Octopus* e *Amphioctopus*. (Fig. 20).

È stata costruita quindi, con l'ausilio di del software Primer3, una coppia di primer che amplificasse una sequenza molto corta e con degli SNP (120 bp) che distinguessero *Octopus vulgaris* dalle altre specie (Tab. 13).

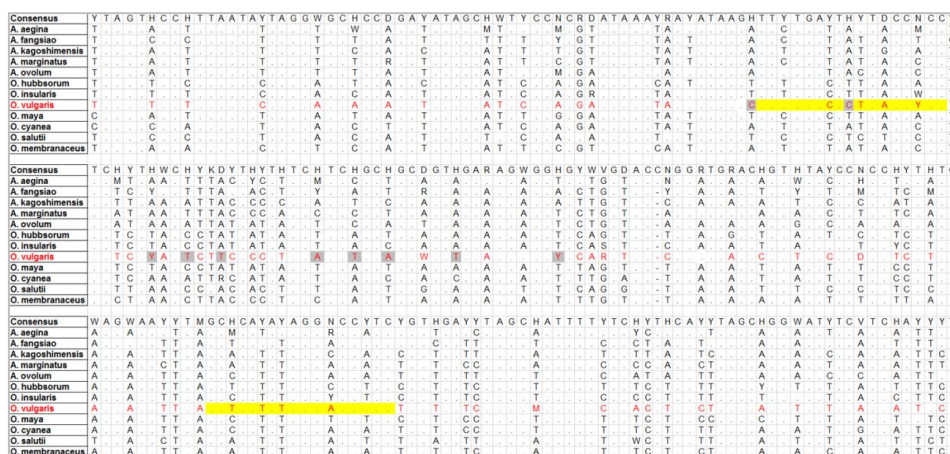


Fig. 20: Allineamento delle sequenze consenso del gene Citocromo Ossidasi subunità I di alcune specie appartenenti ai generi *Octopus* e *Amphioctopus* per il disegno dei primer Vulgarix_F e Vulgarix_R. La sequenza nominata "consensus" è stata creata dai consensi delle sequenze del gene Citocromo Ossidasi subunità I delle specie analizzate. In giallo sono state evidenziate i tratti di sequenza su cui sono stati disegnati i primer e in grigio invece gli SNP presenti in *O. vulgaris*.

Primer utilizzati per l'amplificazione in Real Time PCR di <i>Octopus spp.</i>		
Nome dei primer	Sequenza	Tm
Vulgarix_F	5'-CTTYTGACTCTTACCYCC-3' (18)	53,7°C
Vulgarix_R	3'-GARGGTCCTATATGAGC-5' (17)	51,6°C

Tab. 13: Caratteristiche dei primer Vulgarix utilizzati per la metodica di riconoscimento di *O. vulgaris* in PCR Real-Time.

Il set di primer è stato quindi testato con una metodica che prevedesse l'analisi delle HRM utilizzando una mix di reazione contenente Acqua MGB, master mix Precision Melt Supermix (Bio-Rad) e la coppia di primers forward e reverse alle concentrazioni riportate in Tab. 14.

Il termociclizzatore utilizzato per la PCR Real-Time è il *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System*.

Mix PCR per High Resolution Melting Analysis (HRMA)			
Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume X1 (µL)
Acqua MGB			4,7
Precision Melt Supermix	2X	1X	10
Primer: Vulgarix_F	100µM	0,6µM	0,15
Primer: Vulgarix_R	100µM	0,6µM	0,15
VOLUME TOTALE MIX			15
VOLUME DI DNA			5
VOLUME TOTALE DI REAZIONE			20

Tab. 14: Mix di PCR utilizzata per la prova di riconoscimento di *O. vulgaris* in PCR Real-Time con Precision Melt Supermix.

Visti i risultati non soddisfacenti dei test si è deciso di non sfruttare l'analisi HRM e di concentrare l'attenzione non più sull'identificazione di tutte le specie prese in esame bensì sulla discriminazione tra *O. vulgaris*, specie di maggior pregio a livello commerciale, e le altre specie sulla base del ciclo soglia (Ct) che, nelle prove preliminari, si attesta su valori nettamente più bassi e distinguibili per *Octopus vulgaris* rispetto alle altre specie testate. È stata quindi ottimizzata la *MasterMix* utilizzando la *SsoFast EvaGreen* (Bio-Rad) mantenendo lo stesso set di primer Vulgarix (Tab. 15).

Mix PCR per Real Time PCR			
Reagente	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	Volume X1 (µL)
Acqua MGB			4,7
Sso Fast EvaGreen	2X	1X	10
Primer: Vulgarix_F	100µM	0,6µM	0,15
Primer: Vulgarix_R	100µM	0,6µM	0,15
VOLUME TOTALE MIX			15
VOLUME DI DNA			5
VOLUME TOTALE DI REAZIONE			20

Tab. 15: Mix di PCR utilizzata per la prova di riconoscimento di *O. vulgaris* in PCR Real-Time con Sso Fast EvaGreen Mastermix.

4.2.5. Preparazione del campione standard

Per la messa a punto della metodica è stato preparato un controllo positivo da utilizzare come standard in tutte le prove. Per fare ciò è stato purificato un prodotto di PCR ottenuto con il set di primer CoiFish^[39] a partire da un campione di *O. vulgaris* identificato sia morfologicamente che tramite Barcoding.

Per la purificazione è stato utilizzato il kit QIAquick® Spin (Quiagen) secondo la procedura indicata nel manuale d'uso (QIAquick® Spin Handbook).

Il DNA purificato è stato quantificato mediante spettrofotometro NanoDrop (ThermoScientific) e attraverso un software online a libero accesso (<http://bio/dnacopynum.php>) è stato calcolato il numero di copie di DNA presenti nel campione di partenza.

4.2.6. Raccolta campioni GDO

Una volta messa a punto la metodica è stata testata su campioni acquistati nei supermercati. Sono stati scelti prodotti contenenti solo una specie appartenente alla famiglia *Octopodidae* trattato in vari modi: preparati (ossia eviscerati e congelati in cui l'animale ha perso integrità anatomica), o trasformati (cotti o marinati, con l'aggiunta o meno di altri ingredienti).

Sono stati acquistati 77 campioni in supermercati della provincia di Venezia, Rovigo, Ferrara, Padova, Vicenza e Trento. Da ogni campione è stato estratto il DNA ed è stata condotta sia l'analisi di Barcoding, sia l'analisi in PCR Real-Time.

Per ogni campione sono state recuperate le informazioni salienti in etichetta: è stata considerata la provincia di provenienza, la specie dichiarata, l'area di pesca e la tipologia di prodotto (preparato o trasformato)

4.2.7. Analisi statistica dei dati

L'analisi dei campioni reperiti in commercio ha permesso di valutare statisticamente alcuni parametri di congruenza tra il metodo di riferimento Barcoding (*gold standard*) e il nuovo sistema proposto mediante PCR real-time. L'analisi di campioni reperiti in commercio ha inoltre permesso di stabilire alcuni parametri utili a saggiare le performance diagnostiche del metodo proposto e l'effettiva applicabilità a campioni reali (es. trattati termicamente ecc). Le analisi statistiche sono state effettuate mediante software SAS (SAS 9.3, Institutelnc., Cary NC) utilizzando la FREQ Procedure^[33].

Nel caso della valutazione dell'affidabilità del ciclo soglia proposto per la discriminazione tra campioni positivi (*Octopus vulgaris*) e campioni negativi (non-*Octopus vulgaris*) (ct>30) sono state condotte statistiche descrittive dei gruppi esaminati e i dati sono stati riassunti mediante utilizzo di Box plot e scatter plot.

La valutazione del cut-off ottimale è stata effettuata mediante l'analisi della curva ROC, la quale rappresenta la sensibilità in funzione del complementare della specificità (1-specificità). La curva ROC definisce un'area sottesa (AUC, *area under the curve*) che ha valore massimo pari a 1, corrispondente a valori di sensibilità e specificità del 100%. In questo caso il test diagnostico non presenta falsi positivi o falsi negativi.

La valutazione dell'AUC permette di avere al contempo una stima dell'accuratezza del metodo proposto^[40]:

- $AUC = 0.5$ test non informativo
- $0.5 < AUC \leq 0.7$ test poco accurato
- $0.7 < AUC \leq 0.9$ test moderatamente accurato
- $0.9 < AUC < 1.0$ test altamente accurato
- $AUC = 1.0$ test perfetto

La valutazione della K di Cohen è stata effettuata anche in questo caso per confrontare i risultati della classificazione ottenuta mediante metodo Gold standard (Barcoding) ed il metodo in PCR real-time. Sono stati inoltre investigati i fattori di rischio in merito all'evento frode al fine di evidenziare alcune correlazioni tra le specie commercializzate ed altre informazioni ricavate durante il campionamento (provincia del prelievo, marca del prodotto, denominazione commerciale, specie dichiarata, area di prelievo, tipo di campione e reparto di vendita).

Test del chi quadro χ^2 di Pearson o Fisher (se le risposte attese sono <5)^[41] è stato utilizzato per verificare se la frode può dipendere dalle variabili sopra riportate. La presenza di associazione è stata quantificata con il test V di Cramer^[41, 42], i cui valori sono stati interpretati secondo la Tab. 16^[42].

Livello di associazione	Descrizione
0.00	Nessuna relazione
.00 to .15	Molto debole
.15 to .20	Debole
.20 to .25	Moderata
.25 to .30	Moderatamente forte
.30 to .35	Forte
.35 to .40	Molto Forte
.40 to .50	Fortissima
.50 to .99	Ridondante
1.00	Perfetta relazione

Tab. 16: Tabella interpretativa del test V di Cramer

I fattori di rischio sono inoltre stati investigati contemporaneamente mediante l'uso dell'analisi di regressione logistica.

La regressione logistica^[43,44] è un modello multivariato che relaziona una variabile di tipo dicotomico, presenza assenza, con variabili di tipo sia qualitativo che quantitativo.

Il modello è descritto da

$$\log it(p) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \dots + \beta_k x_k$$

$$\log it(p) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right)$$

Dove p è la probabilità che l'evento y (frode nel nostro caso) si verifichi.

Nel caso in esame, le variabili considerate sono tutte di tipo qualitativo.

L'output della regressione logistica fornisce i valori di rischio di evento (*odds ratio*) di una categoria rispetto ad una categoria di riferimento.

4.3.RISULTATI E DISCUSSIONE

Le Sequenze degli otto campioni morfologicamente affini ad *Octopus membranaceus* utilizzati per le prove di sviluppo del metodo, hanno fornito risultati ambigui, con omologia inferiore al 95%, dando dimostrazione del limite della metodica di Barcoding, la quale non è applicabile quando la specie in esame non è molto studiata ed è quindi presente un gap informativo nei database. Questa lacuna, già osservata nel lavoro di Debenedetti et al nel 2014^[45] è stata affrontata seguendo l'approccio descritto di seguito.

I *primer specifici* "CytB_membra" (Tab. II) sono stati testati sugli otto campioni *O. membranaceus*, 5 di *O. vulgaris*, 5 di *A. marginatus*, 5 di *O. cyanea*, 5 di *A. aegina*, 5 di *O. maya* e 2 di *C. indicus*.

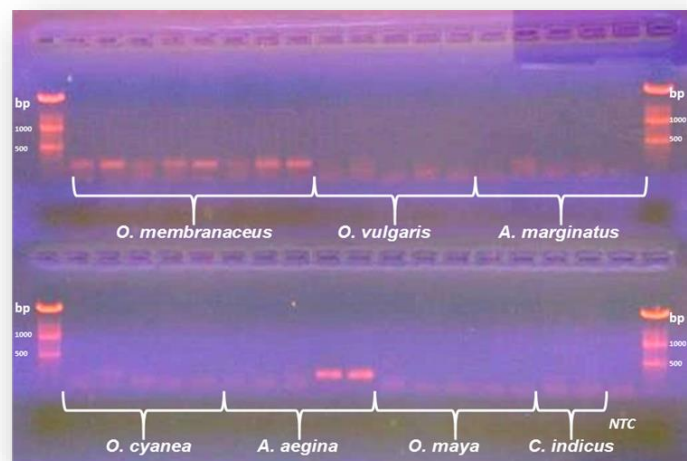


Fig. 21: Gel di agarosio 1% addizionato con etidio bromuro allo 0,006%. Marcatore molecolare XIV Roche 100 pb. Con l'utilizzo dei *primer*CytB_membra gli unici campioni in cui è avvenuta l'amplificazione sono *O. membranaceus* e 2 campioni di *A. aegina*.

Come atteso dalle analisi *in silico* i *primer* amplificano una sequenza di circa 200 pb esclusivamente per quanto riguarda *O. membranaceus* e anche per due esemplari di *A. aegina* (Fig. 21).

Questa amplificazione inaspettata può essere data dal fatto che, come mostrato negli alberi filogenetici costruiti grazie alle sequenze depositate in GenBank (CytB, Fig. 22) e in BOLD

(COI, Fig. 23), si nota che *Octopus membranaceus*, in entrambi i casi, è parafiletico con i campioni appartenenti al genere *Amphioctopus*.

Questi dati confermano i risultati di un altro lavoro condotto da Espiñeira nel 2010^[36], in cui l'albero filogenetico ottenuto dal sequenziamento di CytB mostra come *Amphioctopus aegina* e *Octopus membranaceus* siano filogeneticamente affini.

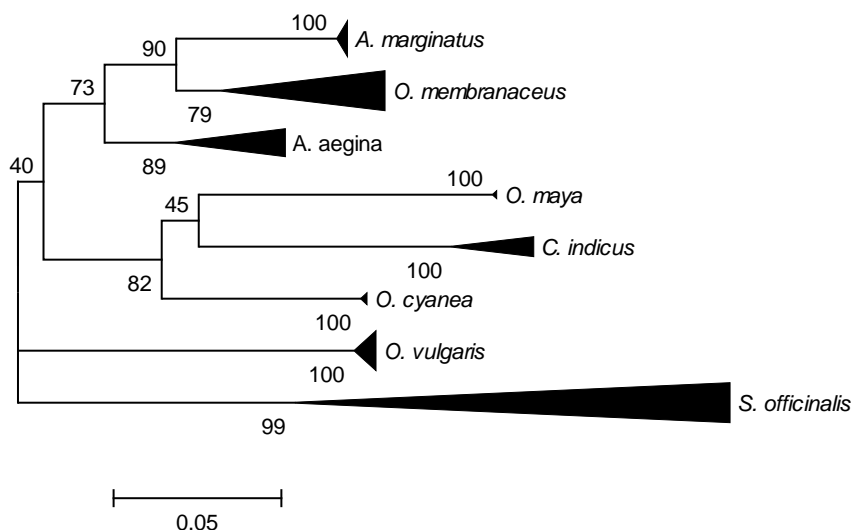


Fig. 22: Albero filogenetico del gene COI. *Neighbour joining*, modello Tamura-Nei, 1000 *Bootstrap*. Per la costruzione dell'albero sono state utilizzate le sequenze delle specie indicate presenti in BOLD. I rami formati dalle varie sequenze sono stati raggruppati per specie.

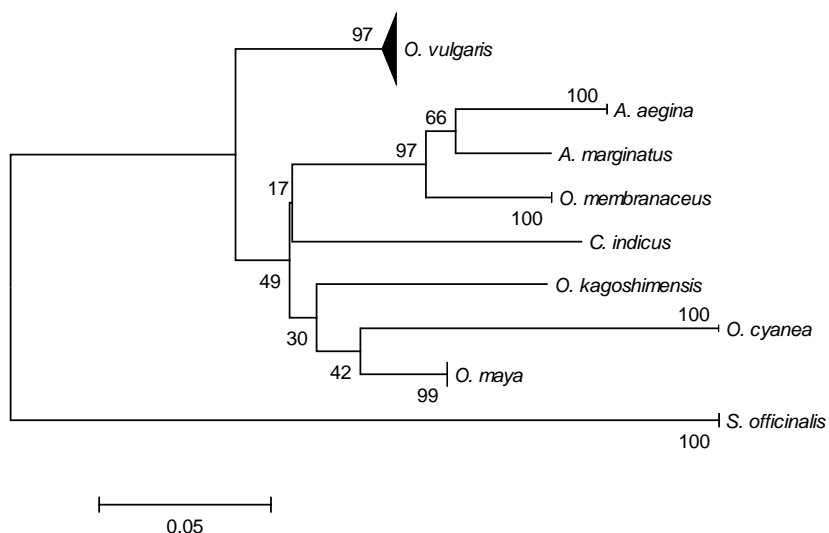


Fig. 23: Albero filogenetico del gene CytB. *Neighbour joining*, modello Tamura-Nei, 1000 *bootstrap*. Per la costruzione dell'albero sono state utilizzate le sequenze delle specie indicate presenti in GenBank. I rami formati dalle varie sequenze sono stati raggruppati per specie.

Tutti gli amplificati sono stati sequenziati e analizzati mediante BLAST e il risultato ottenuto è stato per tutti gli esemplari una percentuale di identità $\geq 95\%$ e una *query coverage* del 100% tra le sequenze ottenute e quelle depositate di *O. membranaceus*. Anche le due sequenze di *A. aegina* sono state confermate attraverso l'analisi di sequenza. Le sequenze del gene COI degli stessi esemplari di *O. membranaceus* sono state depositate in GenBank (Tab. 17).

Accession number provvisori delle sequenze depositate		
Codice submission	Sequenza	Accession Number provvisorio
BankIt1749515	1	KM360526
	2	KM360527
	3	KM360528
	4	KM360529
	5	KM360530
	6	KM360531
	7	KM360532
	8	KM360533

Tab. 17: Accession number delle sequenze di COI di *Octopus membranaceus* inserite in NCBI.

- *Test di temperatura dei primer*

Dopo aver disegnato *in silico* i primer "Vulgarix" che amplificassero la sequenza di DNA di interesse all'interno del gene COI, sono state fatte prove in PCR *Real-Time* con campioni appartenenti a specie diverse (Tab. 18), testando differenti temperature e una mix di reazione adatta per l'analisi in alta definizione delle curve di melting per testare quale fosse la temperatura ottimale per l'amplificazione. Poiché la temperatura di *annealing* dei primer calcolata è di 53,7°C e 51,6°C sono state testate temperature crescenti per valutare se la specificità dei primer è proporzionale all'aumento della temperatura di *annealing*.

Inizialmente ci si era prefissati come obiettivo la messa a punto di un metodo che si basasse sullo studio delle curve di melting ad alta risoluzione (vedi capitolo HRM), che permettesse non solo il rapido riconoscimento di *Octopus vulgaris* ma anche delle altre specie appartenenti al genere *Octopus* e *Amphioctopus* più comunemente commercializzate.

Campioni utilizzati			
Nome latino	Nome italiano*	Numero di esemplari	Legenda
<i>Octopus vulgaris</i>	Polpo	46	■
<i>Octopus cyanea</i>	Polpo indopacifico	4	■
<i>Octopus membranaceus</i>	Polpo indopacifico	9	■
<i>Octopus maya</i>	Polpo messicano	3	■
<i>Octopus kagoshimensis</i>	-	1	■
<i>Amphioctopus marginatus</i>	Polpo indopacifico	16	■
<i>Amphioctopus aegina</i>	Polpo indopacifico	6	■
<i>Cistopus indicus</i>	Polpo indopacifico	2	■
<i>Callistoctopus spp.</i>	-	1	■
<i>Sepia officinalis</i>	Seppia	2	■
<i>Sepia pharaonis</i>	Seppia indopacifica	3	■
<i>Sepiella inermis</i>	Seppia orientale	2	■
<i>Eledone cirrhosa</i>	Moscardino	2	■
<i>Eladona moschata</i>	-	2	■
<i>Uroteuthis duvaucelii</i>	Calamaro indiano	2	■
<i>Uroteuthis edulis</i>	Calamaro indopacifico	1	■

*: secondo il Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 31 Gennaio 2008 (G.U. n. 45 del 22 Febbraio 2008) e successive integrazioni fino al decreto del 19 Novembre 2012 (G.U. n. 27 del 1 Febbraio 2013)

Tab. 18: Tabella dei campioni utilizzati per la messa a punto della metodica di riconoscimento di *O. vulgaris*. La legenda fa riferimento al colore utilizzato per le curve di amplificazione nelle prove di amplificazione in PCR real-time.

La prima prova è stata quindi condotta ad una temperatura di *annealing* di 58°C, utilizzando il software dedicato *High Resolution Melt (HRM) Software v3.0.1*

Da quanto emerge nella Fig. 24 ciò non è possibile a causa, probabilmente, dell'eccessivo polimorfismo delle sequenze analizzate che rende estremamente complessi i bilanci energetici necessari alla dissociazione delle doppie eliche e quindi non distinguibili gli andamenti delle curve di denaturazione^[46].

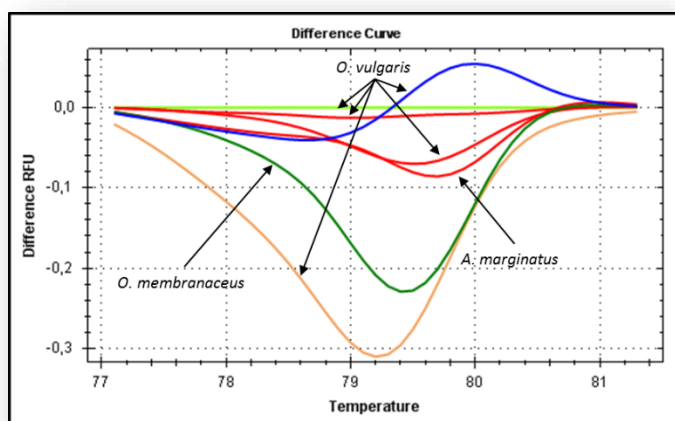


Fig. 24: Curve di melting analizzate con il software *High Resolution Melt (HRM) Software v3.0.1*

In questa prima serie di prove, oltre alle curve di melting, sono state studiate anche le curve di amplificazione ed è stato osservato che i campioni identificati come appartenenti alla specie *Octopus vulgaris* amplificano con un Ct significativamente più basso rispetto a quello dei campioni di altre specie diverse da *O. vulgaris* (Fig. 25).

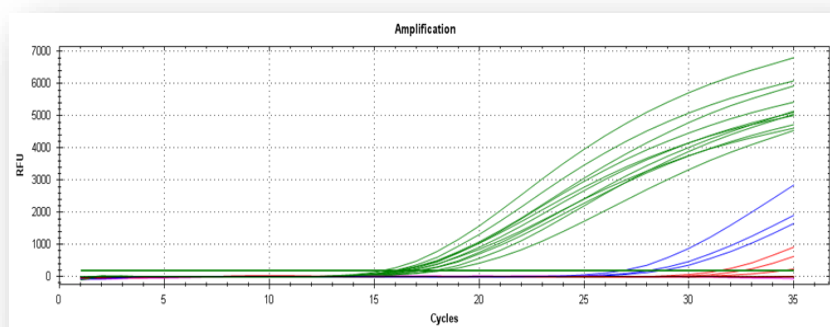


Fig. 25: Curve di amplificazione dei campioni testati nella prova preliminare di PCR *Real-Time*. In verde *Octopus vulgaris*, in blu e in rosso campioni aspecifici.

In un'ottica di ottimizzazione di tempi e costi di analisi si è quindi deciso di proseguire con la messa a punto di un metodo *Real-Time* che non prevedesse l'analisi ad alta risoluzione delle curve di melting. E sono state testate altre temperature di annealing al fine di definire quella ottimale per la clusterizzazione dei campioni appartenenti alla specie *Octopus vulgaris* (Figg. 26,27).

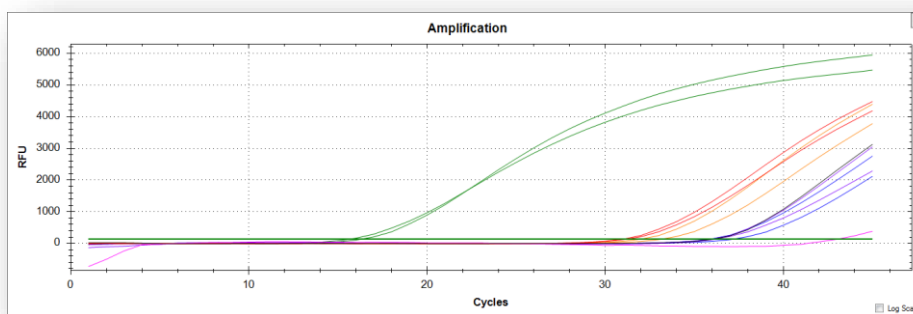


Fig. 26: Curve di amplificazione dei campioni testati con temperatura di *annealing* di 58°C. (Legenda Tab. 18).

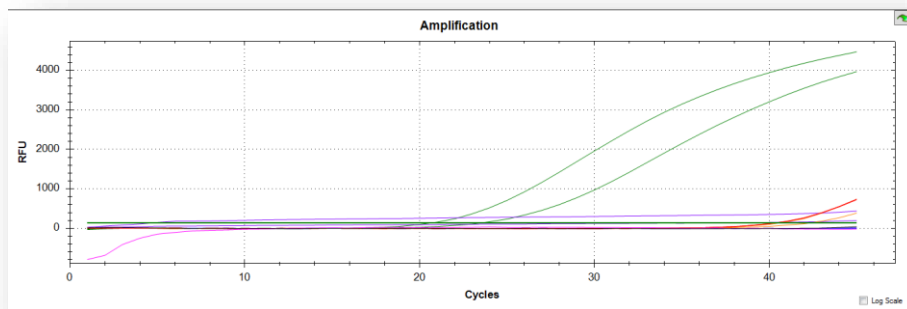


Fig. 27: Curve di amplificazione dei campioni testati con temperatura di annealing di 60°C. (Legenda Tab. 18).

Come si può osservare nella Fig. 27 la prova con temperatura di annealing di 60°C è risultata più specifica rispetto a quella con la temperatura di annealing di 58°C (Fig. 26) in quanto i campioni non-*Octopus vulgaris* non vengono amplificati oppure le curve hanno un Ct molto alto. È stato scelto quindi di mantenere 60°C come temperatura di annealing dei primer.

- *Prova con Eva Green I*

Avendo scelto quindi di impostare la metodica sullo studio dei Ct e non sullo studio delle curve di melting, è stata fatta una prova di amplificazione con una master mix con intercalante Eva Green I. Per verificare la ripetibilità dell'analisi con la nuova master mix è stata fatta una prima prova comparativa ed è stata considerata proporzionale alla precedente in quanto le curve di amplificazione dei campioni non-*Octopus vulgaris* hanno comunque un Ct più alto rispetto a quelle di *Octopus vulgaris* formando un cluster nettamente diviso e distinguibile rispetto a quest'ultime (Figg. 28,29).

Nella prova fatta con master mix SsoFast™EvaGreen®Supermix (BioRad) (Fig. 29) si nota che, rispetto alla prova fatta con la Precision MeltSupermix (BioRad) (Fig. 28), vi è una diminuzione del valore di Ct per tutti i campioni testati.

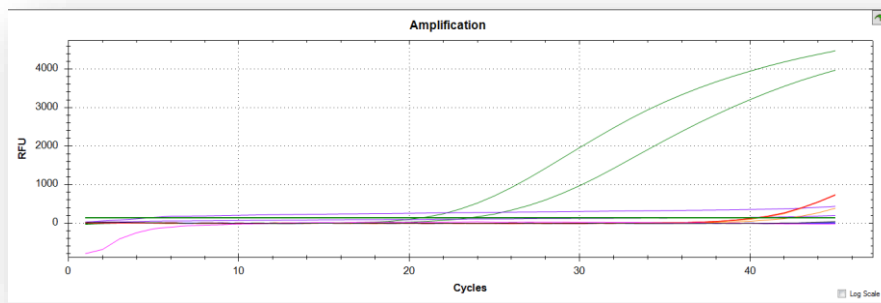


Fig. 28: Curve di amplificazione dei campioni testati con *Precision MeltSupermix* (BioRad) (Legenda Tab. 18).

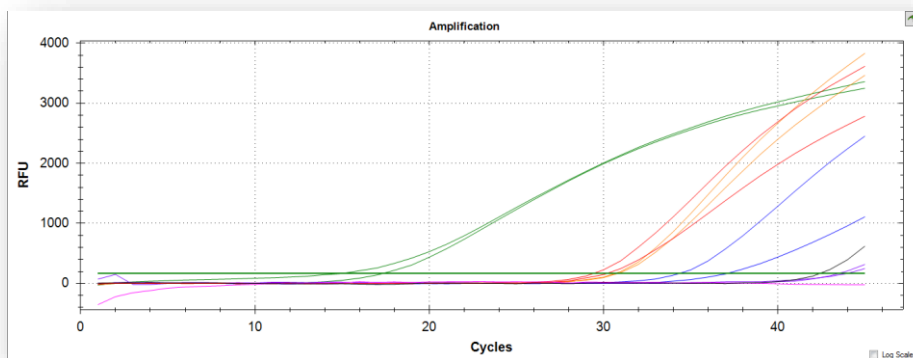


Fig. 29: Curve di amplificazione dei campioni testati con *SsoFast™ EvaGreen® Supermix* (BioRad). (Legenda Tab. 18).

- *Determinazione del campione positivo standard*

Dopo le prime prove di messa a punto, si è reso necessario determinare quale fosse il valore medio di Ct intorno al quale avviene l'amplificazione dei campioni di *O. vulgaris*.

Per determinare tale valore sono stati testati tutti gli esemplari di *Octopus vulgaris* e si è osservato che la media dei Ct è pari a 20 (Fig. 30).

Vista la natura puramente qualitativa del metodo, si è ritenuto sufficiente l'utilizzo di un amplificato piuttosto che di un plasmide come controllo positivo standard, con l'obiettivo di definire un valore definito e riproducibile di *threshold* per tutte le successive analisi.

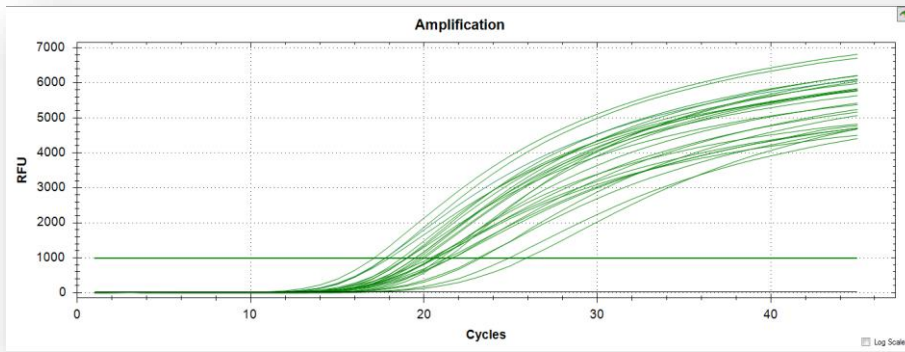


Fig. 30: Prova in PCR *Real-Time* per stabilire il Ct medio delle curve di amplificazione formate da *Octopus vulgaris*. (Legenda Tab. 18).

È stato quindi scelto un campione che avesse, dopo la normalizzazione effettuata dal software collegato al termociclatore, un Ct uguale a 20. Dopo l'amplificazione, il DNA è stato purificato e diluito serialmente 1:100 da tal quale a 10^{-6} per a creare una retta di taratura.

È stata quindi fatta una prova di PCR *Real-Time* utilizzando in triplicato il campione tal quale e le diluizioni 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} .

Utilizzando i Ct delle curve dei campioni alle varie diluizioni è stata costruita una retta di taratura per valutare l'efficienza della reazione (Fig. 31).

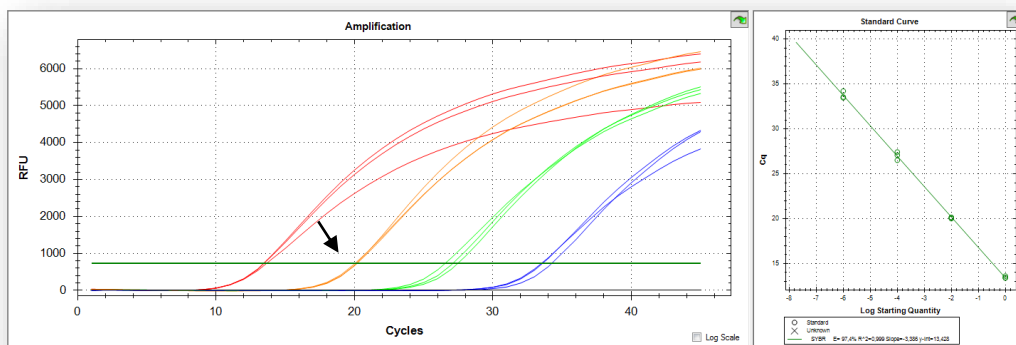


Fig. 31: Curve di amplificazione del campione tal quale e delle diluizioni 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} . (Legenda Tab. 18).

La pendenza (Slope), e il coefficiente di regressione lineare della retta di taratura ottenuta sono rispettivamente pari a -3,386 e 0,99. Di conseguenza, applicando la formula per il calcolo dell'efficienza ($E=10^{(-1/Slope)-1}$), risulta che l'efficienza di amplificazione della prova è

del 97,4%. Tutti i parametri sono entro i limiti di accettabilità^[47], a dimostrazione della buona riuscita della prova.

L'amplificato di partenza diluito a 10^{-2} è stato perciò utilizzato come standard positivo e, sulla base del risultato ottenuto, la linea di *threshold* in tutte le successive prove è stata regolata sulla base del valore di Ct di questo controllo positivo.

- Prove di Specificità

Una volta individuato lo standard positivo sul quale impostare la linea *threshold*, sono state condotte prove di specificità per verificare che, con campioni già identificati mediante Barcoding, la metodica non fornisca falsi positivi, cioè che campioni dichiarati specie diverse da *Octopus vulgaris* amplifichino con Ct caratteristici della specie ricercata. L'obiettivo infatti è quello di identificare in modo rapido se il campione analizzato è o meno *Octopus vulgaris*. Nel caso in cui un campione abbia una curva di amplificazione caratterizzata da un Ct alto si procederà come solitamente si opera per il riconoscimento di specie ossia con la metodica di Barcoding che verificherà la presenza eventuale di falsi negativi ossia la presenza di *Octopus vulgaris* tra i campioni non-*Octopus vulgaris*.

Dall'osservazione dei risultati delle prove di specificità si è provveduto a impostare il valore di cut-off della metodica utilizzando i campioni in Tab. 18.

Le prove sono state condotte in duplicato in giorni diversi e da diversi operatori per valutare la riproducibilità intra-laboratorio (Figg. 32, 33, 34, 35).

Osservando i 2 cluster netti di curve che si vengono a creare tra i campioni di *O. vulgaris* e il gruppo "non-*Octopus vulgaris*" si è valutato di impostare un Ct pari a 30 come cut-off discriminante tra i due gruppi.

Gli estratti dei campioni amplificati sono stati tutti diluiti a 10 ng/ μ L in modo da non avere l'influenza della concentrazione di DNA di partenza sui valori di Ct.

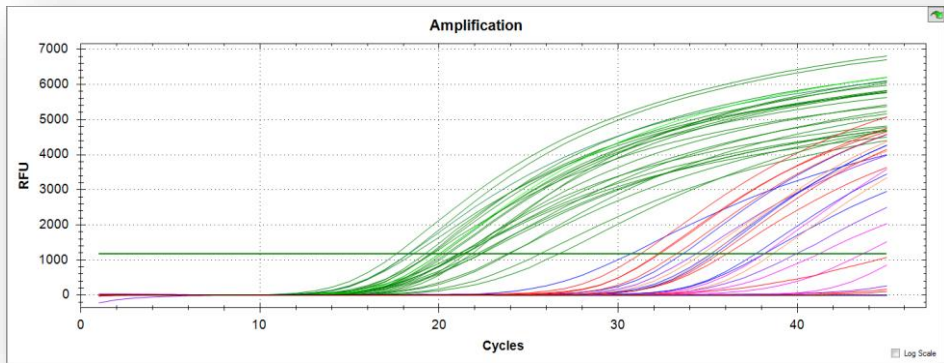


Fig. 32: Prima prova di specificità. (legenda Tab. 18, curva verde chiaro campione positivo).

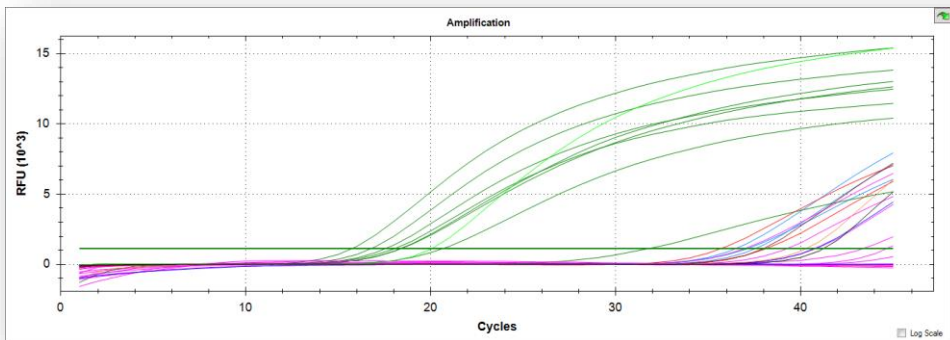


Fig. 33: Seconda prova di specificità. (legenda Tab. 18, curva verde chiaro campione positivo).

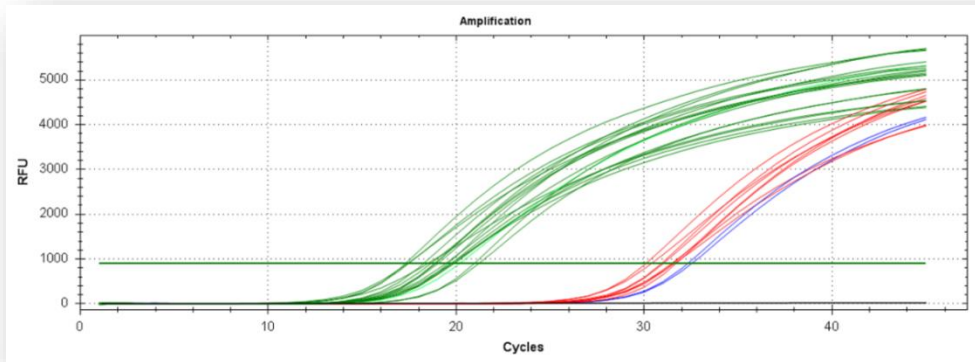


Fig. 34: Terza prova di specificità. (legenda Tab. 18, curva verde chiaro campione positivo).

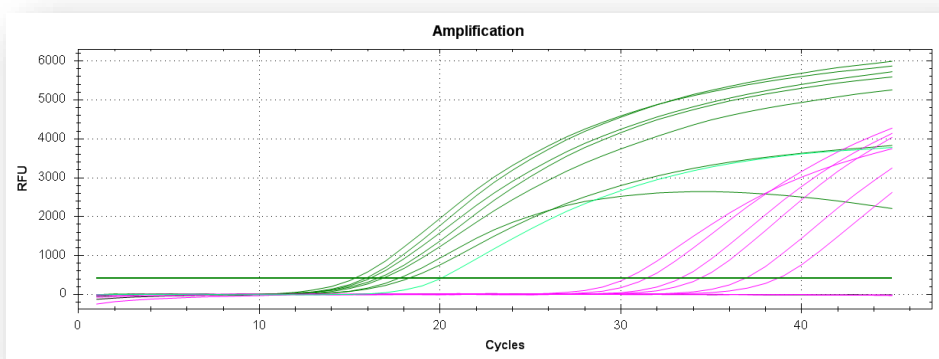


Fig. 35: Quarta prova di specificità. (legenda Tab. 18, curva verde chiaro campione positivo).

- *Frodi riscontrate in prodotti preparati e trasformati*

I campioni raccolti dalla GDO sono stati analizzati sia mediante Barcoding che utilizzando la metodica PCR *Real-Time* messa a punto.

L'analisi in PCR *Real-Time* ha permesso di individuare le frodi relative ad *Octopus vulgaris* (Fig. 36). Le curve di amplificazione dei campioni dichiarati *Octopus vulgaris* che si sono rivelati essere non-*Octopus vulgaris* sono state colorate in rosso (21 su 77), in verde le curve dei campioni dichiarati *O. vulgaris* e in blu i campioni appartenenti ad altre specie che non sono coinvolti in frodi identificabili con questa metodica. È stato osservato che i prodotti che hanno subito un processo termico o che sono stati addizionati di ingredienti hanno presentato medesime performance di amplificazione similmente ai campioni freschi o congelati.

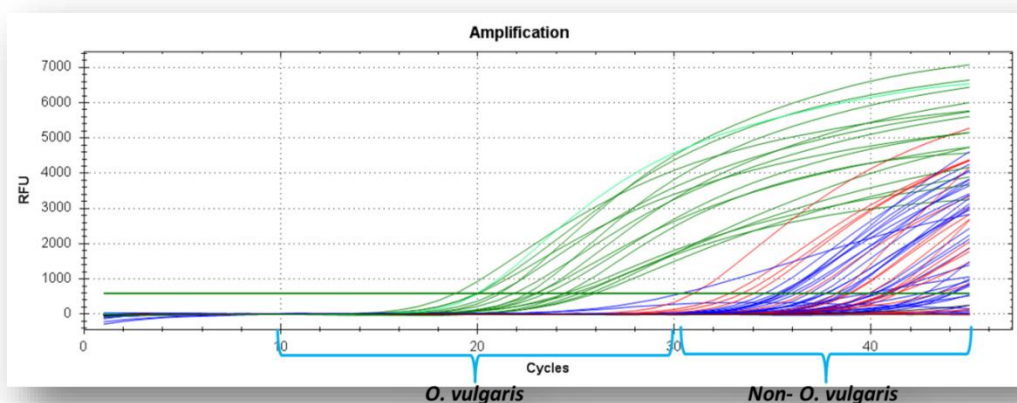


Fig. 36: Analisi dei prodotti acquistati nei supermercati. In rosso i campioni frodati, in verde *O. vulgaris* e in blu i campioni appartenenti ad altre specie. In verde chiaro il campione positivo.

È possibile osservare inoltre che i prodotti in cui è più probabile trovare una frode di sostituzione sono i prodotti trasformati. Dei 41 prodotti dichiarati *Octopus vulgaris* infatti, 26 erano trasformati e 15 preparati. Nei trasformati la frode è pari a 65,4% e nei prodotti preparati è pari al 26,7%. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i prodotti trasformati in questo caso sono spesso venduti a pezzi o come carpacci. È perciò impossibile, se non con tecniche molecolari, rilevare la specie contenuta nel prodotto.

L'analisi Barcoding ha permesso di evidenziare un altro tipo di frodi di etichettatura non corretta che non riguarda *Octopus vulgaris*.

Come evidenziato in Tab. 19 infatti, vi sono prodotti dichiarati *Octopus membranaceus*, *Cistopus indicus*, *Octopus cyanea* e *Octopus dofusii* risultano, in alcuni casi, frodati con altre specie dello stesso valore commerciale. In questi casi si è comunque di fronte ad una frode commerciale di sostituzione ma di impatto economico nullo in quanto l'acquirente del prodotto non viene danneggiato. È stato deciso di considerare comunque questo genere di casi come frode in quanto la specie venduta non corrisponde con quella dichiarata.

Quattro campioni identificati tramite Barcoding come *Octopus vulgaris*, hanno fornito una curva di amplificazione con Ct superiore a 30. Questo però non andrebbe ad inficiare l'eventuale referto in quanto tutti i campioni con valore di $Ct \geq 30$ vengono sottoposti a sequenziamento, evitando così di incorrere in falsi positivi.

		Barcoding												
		<i>O. vulgaris</i>	<i>O. cyanea</i>	<i>O. maya</i>	<i>O. membranaceus</i>	<i>O. punctatus</i>	<i>C. indicus</i>	<i>A. aegina</i>	<i>A. marginatus</i>	<i>C. minor</i>	<i>C. tawainicus</i>	<i>D. gigas</i>	Non- <i>O. vulgaris</i>	totale
Dichiarato	<i>O. vulgaris</i>	20	12	2			1		1	2		1	2	41
	<i>O. cyanea</i>		16					1						17
	<i>O. dofusii</i>				1			1						2
	<i>O. maya</i>	1		4										5
	<i>O. membranaceus</i>		1				1	1	1		3			7
	<i>O. punctatus</i>		1			2								3
	<i>C. indicus</i>										1			1
	<i>A. aegina</i>							1						1
	totale	21	30	6	1	2	2	4	2	2	4	1	2	77

Legenda

- Campioni etichettati correttamente
- Frodi di sostituzione che comportano danno economico
- Errori di etichettatura

Tab. 19: Confronto tra specie dichiarata in etichetta e risultato dell'analisi di Barcoding.

- *Risultati analisi statistiche:*

Di seguito vengono riportate le analisi di distribuzione dei valori (Fig. 37), lo *Scatterplot* (Fig. 38), la curva ROC (Fig. 39) e *Sensitivity and Specificity against cutpoint curves* (Fig. 40). Questi test hanno avvalorato le osservazioni fatte durante la fase di messa a punto della metodica. Il Ct medio del cluster delle curve di *Octopus vulgaris* è pari a 20 e il valore di cut off tra *Octopus vulgaris* e le altre specie è pari a 30.

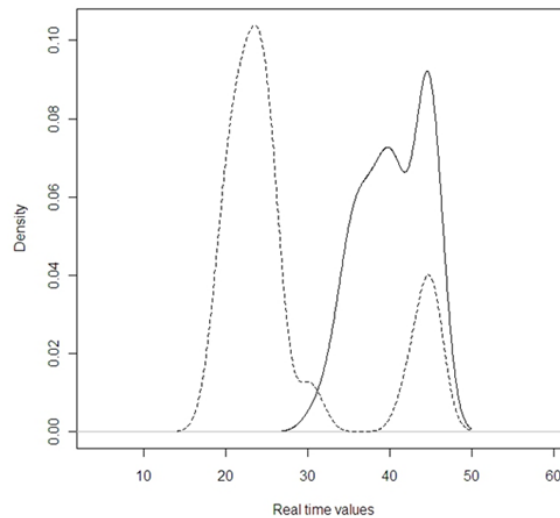


Fig. 37: Analisi delle curve di distribuzione dei valori.

L'analisi delle curve di distribuzione dei valori indica a quali valori di Ct vi è la maggior presenza di campioni. Risulta evidente che al Ct 20 vi è la massima concentrazione di campioni identificati come *Octopus vulgaris* (linea tratteggiata). I campioni identificati come non-*Octopus vulgaris* hanno tutti un Ct superiore a 30 (linea continua).

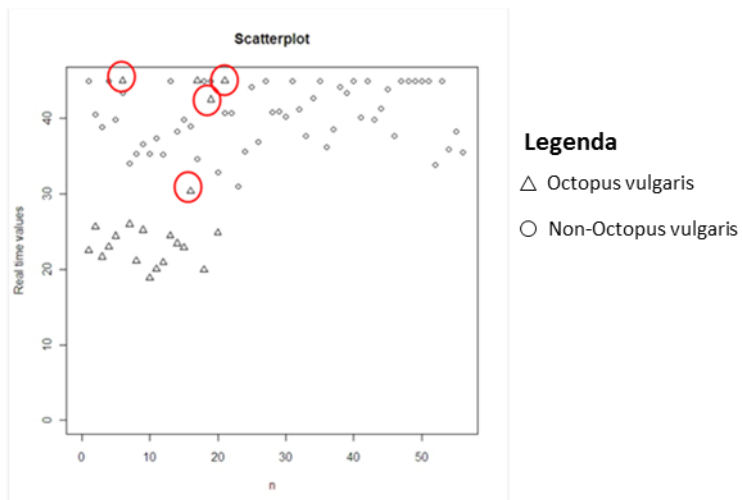


Fig. 38: Scatterplot test.

In Fig. 38 sono raffigurati i valori di Ct dell'analisi *Real-Time* (asse delle ordinate) e di Barcoding (asse delle ascisse). Cerchiati in rosso i campioni identificati come *Octopus vulgaris* che hanno ottenuto un Ct superiore a 30. La diversa e netta clusterizzazione tra *O. vulgaris* e le altre specie conferma di quanto osservato nella messa a punto del metodo.

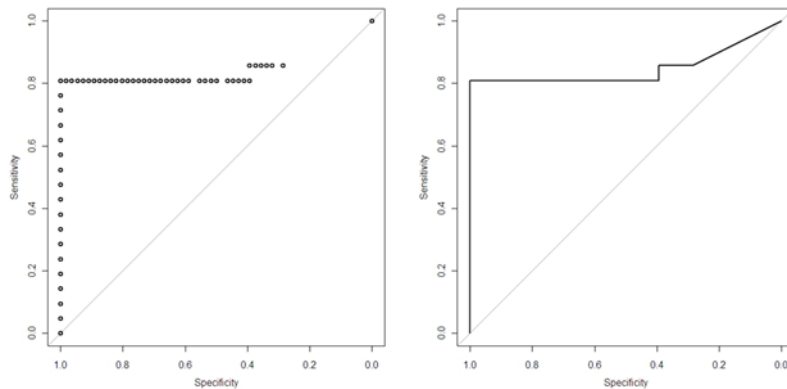


Fig. 39: Curva ROC. L'area delimitata dalla curva è pari a 0,8486. Con valori compresi tra $0.7 < AUC \leq 0.9$ il test è da considerarsi moderatamente accurato.

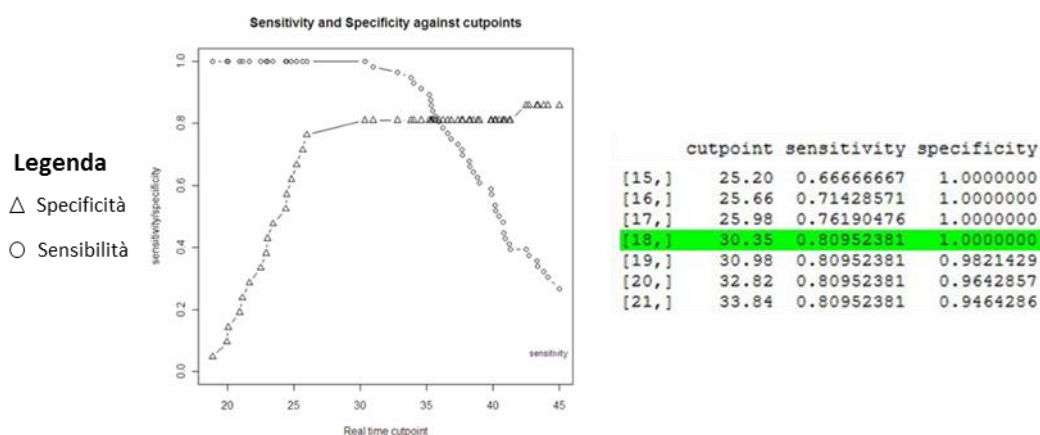


Fig. 40: *Sensitivity and Specificity against cutpoint curves*. Il valore di Ct che mostra il la maggiore sensibilità (80,95%) mantenendo una specificità del 100% è pari a 30.

Altri test di *agreement* hanno confermato la concordanza tra la metodica di PCR *Real-Time* e il *Gold standard*. È stato calcolato il parametro Kappa di Cohen che risulta essere uguale a 0,8608 cioè all'86,08%. Ciò significa che in termini di concordanza secondo i parametri stabiliti da Landis e Kock nel 1977^[34], i due test presentano un quasi perfetto accordo (0,81-1,00) e secondo i parametri di riproducibilità di Fleiss la riproducibilità del metodo è eccellente (>0,75).

- *Analisi dei fattori di rischio frode*

L'analisi bivariata attraverso la costruzione di tabelle 2xN, ha permesso di mettere in luce dei dati interessanti su quali siano le variabili considerate più correlate alla frode. Come atteso una delle variabili correlate alla frode è la specie dichiarata. Inoltre sembra che anche l'area di pesca sia fortemente correlata alla frode; in particolare i prodotti nei quali l'area di pesca non è dichiarata sembrano i più associati al rischio di frode. I test utilizzati per l'analisi bivariata sono il χ^2 di Pearson che permette di verificare la significatività della correlazione mentre il V di Cramer quantifica la correlazione e in base ai livelli di associazione è possibile derivare quanto forte questa sia (Fig. 41).

	Provincia	Marca del prodotto	Denominazione commerciale	Specie dichiarata	Livello di associazione	Descrizione
Chi quadro	NS	NS	NS	p=0.0046	0.00	Nessuna relazione
V Cramer				0.3735	.00 to .15	Molto debole
	Area di pesca	Tipo di campione	Reparto		.15 to .20	Debole
Chi quadro	p=0.0041	NS	NS		.20 to .25	Moderata
V Cramer	0.4463				.25 to .30	Moderatamente forte
					.30 to .35	Forte
					.35 to .40	Molto Forte
					.40 to .50	Fortissima
					.50 to .99	Ridondante
					1.00	Perfetta relazione

Fig. 41: Analisi bivariata. Il test χ^2 di Pearson correla 2 variabili tra quelle considerate

Legenda: NS = Non Significativo, p = p-value.

Il test V di Cramer quantifica la correlazione come “Molto forte” nel caso della specie dichiarata e “Fortissima” nel caso dell’area di pesca.

Questo dato è stato anche confermato dall’analisi di regressione logistica. Questa analisi considera contemporaneamente le variabili: provincia del prelievo, marca del prodotto, denominazione commerciale, specie dichiarata, area di pesca, tipo di campione e reparto (Tab. 20).

Type 3 Analysis of Effects			
Effect	DF	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq
Provincia	3	2.3067	0.5112
Marca	1	0.4351	0.5095
Denominazione	1	0.0006	0.9808
Specie	2	7.1305	0.0283
Tipo	1	0.0037	0.9514
Area	4	12.2376	0.0157
Reparto	2	1.3017	0.5216

Tab. 20: Analisi di regressione logistica.

Una volta individuate attraverso l’analisi bivariata e l’analisi di regressione logistica le categorie di variabili nominali implicate nella frode (areale e specie) è stata condotta la valutazione degli Odds Ratio per le differenti categorie considerate. L’analisi degli Odds ratio permette di valutare quali siano le categorie più legate alla frode e quali no (Fig. 42).

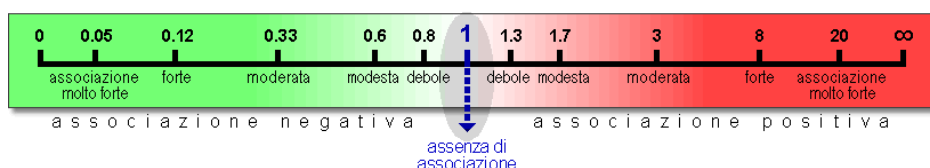


Fig. 42: schema di interpretazione dei valori di rischio relativo e Odds ratio. (Fonte: www.quadernodiepidemiologia.it)

Dalla Fig. 43 emerge che nella variabile “Specie” è più frequente che si realizzi l’evento “Frode” in prodotti commercializzati contenenti specie differenti da *Octopus vulgaris* e *Octopus cyanea* anche se questo risulta statisticamente significativo solo considerando i confronti con *Octopus cyanea* (Tab. 21). Questo è dovuto al fatto che sono state considerate “Frodi” anche gli errori di etichettatura legati alle specie di minor valore commerciale. Quindi da questo si evince che il problema degli errori di etichettatura risulta molto rilevante e dovrebbe essere approfondito in parallelo al caso di frodi di sostituzione della sola specie *Octopus vulgaris*.

Per quanto riguarda la variabile “Specie” si può notare inoltre che nei prodotti dichiarati *Octopus cyanea* l’evento “Frode” si verifica in misura minore rispetto ai prodotti etichettati come *Octopus vulgaris* o Polpo.

Per quanto riguarda invece la variabile “Area di pesca” si può notare che la propensione al verificarsi dell’evento in esame è maggiore nella categoria “Oceano Indiano” rispetto le categorie “Mediterraneo” e “Oceano Atlantico”. Mentre l’“Area non dichiarata” pur presentando una tendenza maggiore non risulta statisticamente significativa (Tab. 21).

Il test di Hosmer-Lemeshowa accetta l’ipotesi di bontà del modello ($p=0,9228$) e la tabella di corretta classificazione indica che il modello proposto ha una capacità di classificare correttamente il 78% delle osservazioni.



Fig. 43: Analisi Odds ratio delle variabili significative secondo l’analisi di regressione logistica. I pallini blu rappresentano i valori di Odds ratio cioè di rischio di avere l’evento per la categoria di interesse rispetto a quella di riferimento. Le linee rosse rappresentano l’intervallo di confidenza.

La linea grigia tracciata in corrispondenza al valore 1 indica la non significatività del valore di odds ratio. In particolare, se l'intervallo di confidenza dell'odds contiene il valore 1 questo non è significativo e quindi non c'è differenza nel rischio di evento tra le due categorie a confronto.

Analysis of Maximum Likelihood Estimates							
Parameter		DF	Estimate	Standard Error	Wald Chi-Square	Pr > ChiSq	Exp(Est)
Intercept		1	1.9143	1.0678	3.2136	0.0730	6.782
Specie	Non Octopus vulgaris	1	0.2004	0.8335	0.0578	0.8100	1.222
Specie	Octopus cyanea	1	-2.9985	1.1122	7.2683	0.0070	0.050
Area	Atlantico	1	-3.3836	1.2173	7.7267	0.0054	0.034
Area	Mediterraneo	1	-3.8602	1.5110	6.5265	0.0106	0.021
Area	Non dichiarata	1	-1.1760	1.1210	1.1005	0.2942	0.309
Area	Pacifico	1	-1.3254	0.9907	1.7898	0.1810	0.266

Tab. 21: risultati dell'analisi della stima di massima correlazione

4.4. DISCUSSIONE

Il problema dell'identificazione dei molluschi cefalopodi è rappresentato prevalentemente dall'elevata similarità a livello morfologico tra le numerose specie appartenenti alla famiglia *Octopodidae*. L'aumento della commercializzazione e il contemporaneo incremento di nuove specie rende indispensabile lo studio di metodi rapidi ed efficaci per il riconoscimento di specie.

Come si può vedere in Tab. 22 i prezzi dei prodotti dichiarati *Octopus vulgaris* sono sensibilmente più alti dei prodotti dichiarati non *Octopus vulgaris*. Questo dato, sebbene sia frutto di una media tra un numero relativamente esiguo di campioni, conferma il fatto che *Octopus vulgaris* abbia un valore commerciale superiore.

Prezzo medio dei prodotti che contengono <i>Octopus</i> spp. nei supermercati		
Prodotti dichiarati	Preparati	12,4 €/Kg
<i>Octopus vulgaris</i>	Trasformati	17,5 €/Kg
Prodotti dichiarati non <i>Octopus vulgaris</i>	Preparati	8,7 €/Kg
	Trasformati	16,9 €/Kg

Tab. 22: Prezzo medio al chilogrammo dei prodotti acquistati nei supermercati.

Uno dei problemi incontrati durante l'attribuzione mediante Barcoding della specie dei campioni utilizzati come standard per la messa a punto della metodica è stata l'identificazione di *Octopus membranaceus* per la quale non erano mai state depositate sequenze di Citocromo Ossidasi I.

Grazie all'identificazione morfologica di alcuni esemplari di *Octopus membranaceus* e all'identificazione molecolare attraverso il disegno di primer specifici sul gene CytB, è stato possibile ricavare le sequenze del gene Citocromo Ossidasi I (COI) e depositarle in GenBank®.

Tutte le sequenze del gene COI delle specie prese in esame quindi sono state allineate tra di loro e studiate al fine di trovare una zona su cui disegnare dei *primer* adatti a distinguere tra le varie specie considerate.

Inizialmente l'obiettivo era quello di sviluppare una metodica che sfruttasse lo studio delle curve di melting ad alta risoluzione (HRMA), che consiste nello studio dell'andamento delle curve di melting dopo l'amplificazione dei campioni con metodica PCR *Real-Time* EvaGreen.

Il forte polimorfismo inter e intra specifico ha fatto sì che questo tipo di analisi fosse inefficace per gli obiettivi preposti.

Lo studio delle curve di amplificazione ha però dimostrato che la metodica permette di distinguere *Octopus vulgaris* da tutte le altre specie di cefalopodi testate. Infatti tutti i campioni identificati attraverso il Barcoding appartenenti alla specie *Octopus vulgaris* formano un cluster di curve che ha come valore di Ct medio pari a 20 e come Ct massimo (cut-off) pari a 30.

In seguito alla messa a punto della metodica, è stata condotta una sorveglianza sui prodotti provenienti dal triveneto per poter valutare ulteriormente la bontà della metodica e al contempo la percentuale di frodi sui prodotti preparati e trasformati contenenti cefalopodi della famiglia *Octopodidae*.

I 77 prodotti analizzati sono stati prelevati nei supermercati di quattro province (Venezia, Rovigo, Trento e Ferrara) e analizzati sia attraverso la metodica messa a punto in questo lavoro sia attraverso il Barcoding.

Su 36 prodotti con dichiarata in etichetta una specie diversa da *Octopus vulgaris*, quindi di minor pregio e di costo inferiore, 13 contenevano una specie diversa da quella dichiarata (36,2%). Questo dato, osservabile solamente grazie all'analisi Barcoding, conferma quanto osservato da Espiñeira *et al.* nel 2010^[36] e mostra come vi sia una non trascurabile tendenza ad una cattiva gestione del sistema di etichettatura.

Tendenza confermata anche dall'evidenza che ben 25 dei 77 prodotti analizzati non riportavano l'area di pesca.

In casi come questi potrebbe insorgere un problema di carattere ambientale qual'ora le specie commercializzate facciano parte di areali protetti o regolamentati.

I test statistici effettuati hanno confermato la robustezza e l'ottimo accordo tra i risultati ottenuti tramite Barcoding e quelli ottenuti tramite il metodo messo a punto.

Tramite l'analisi di distribuzione dei valori, lo *Scatterplot* la curva ROC e le *Sensitivity and Specificity against cutpoint curves*, è stato confermato anche il valore di Ct pari a 30 come cut-off per l'identificazione di *Octopus vulgaris*, andando inoltre a rafforzare la necessità di analizzare tramite Barcoding tutti i campioni con $ct \geq 30$, onde evitare esiti errati e per confermare la specie, quando necessario, anche degli esemplari non-*Octopus vulgaris*.

Le analisi specifiche sui fattori di rischio delle frodi hanno messo in luce che le variabili correlate alla frode commerciale di *Octopus vulgaris* sono la specie dichiarata e l'area di pesca. In modo particolare l'aumento del rischio è associato ai prodotti dichiarati *O.*

vulgaris e ai prodotti in cui l'area di pesca non sia dichiarata oppure provenienti dall'Oceano Indiano.

Il metodo PCR Real-Time proposto sarà validato secondo le regole della norma ISO/IEC 17025 (Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura).

Per fare ciò è necessaria l'organizzazione di una prova inter-laboratorio che testi la riproducibilità della metodica in condizioni diverse da quelle finora applicate.

Ad oggi sono state svolte le prove riguardanti la fase analitica o preclinica ossia la prova di sensibilità analitica e specificità analitica intra-laboratorio. Per quanto riguarda la fase diagnostica o clinica sono stati testati i campioni acquistati nei supermercati, considerati come campioni di campo, ed è stato condotto il test statistico del calcolo del parametro Kappa di Cohen e il test di McNemar per la valutazione dell'accuratezza diagnostica della sensibilità e specificità della prova posta in esame rispetto al Barcoding.

5. CASI DI STUDIO – HRMA applicata al genere *Thunnus*

5.1. INTRODUZIONE – il genere *Thunnus*

Col termine generico tonno si identifica un gruppo composto da specie di pesci di grandi dimensioni, solitamente pelagiche e a sangue caldo, che colonizzano quasi tutti i mari del pianeta. In particolare, all'interno del genere vengono raggruppate 8 specie: *T. alalunga* (tonno alalunga), *T. albacares* (tonno a pinne gialle), *T. atlanticus*, *T. maccoyii* (tonno australe), *T. obesus* (tonno obeso), *T. orientalis*, *T. thynnus* (tonno rosso) e *T. tonggol* (tonno indo pacifico) (Appendice B).

Il tonno è un prodotto della pesca molto pregiato, che costituisce buona parte delle risorse economiche di alcune nazioni (ad es. il Giappone); non essendo allevato in cattività, viene catturato in mare aperto o intrappolato nelle tonnare (presenti anche sul territorio italiano, in Sicilia e Sardegna). Ovviamente, il sapore della carne di tonno non è uniforme tra le varie specie; quello più pregiato è senz'altro il tonno rosso, mentre il tonno pinne gialle è il più utilizzato per la preparazione di inscatolati^[48].

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Regno	<i>Animalia</i>
Sottoregno	<i>Eumetazoa</i>
Ramo	<i>Bilateria</i>
Superphylum	<i>Deuterostomia</i>
Phylum	<i>Chordata</i>
Superclasse	<i>Ittiopsidi</i>
Classe	<i>Actinopterygii</i>
Ordine	<i>Perciformes</i>
Famiglia	<i>Scombridae</i>
Genere	<i>Thunnus</i>

SOUTH, 1845

Prendendo in considerazione solamente il primo gruppo si è proceduto al disegno di un'altra coppia di *primer* (Tab. 24) denominata THY, questa volta sul gene COI, per l'amplificazione di una zona genomica contenente uno SNP caratteristico solamente per *Thunnus thynnus* (Fig. 48).

		271																					
		*	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**						
CONSENSO THYNNUS	COI	T	C	C	T	T	C	C	C	C	T	T	C	T	T	C	C	T	T	G	C	T	
CONSENSO OBESUS	COI	T	C	C	T	T	C	C	Y	C	T	T	C	T	T	C	C	T	T	G	C	T	
CONSENSO MACCOYII	COI	T	C	C	T	T	C	C	C	C	C	T	T	C	T	T	C	C	T	T	G	C	T

Fig. 48: Sequenze consenso individuate sul gene COI di tre specie appartenenti al genere *Thunnus*. Si può notare nel riquadro corrispondente alla posizione 271 una timina caratteristica per la specie *T. thynnus*.

NOME PRIMER	FUNZIONE	SEQUENCE (5' → 3')	GC %	T _{Melting}
THY_F	<i>forward</i>	AACAACATGAGCTTCTGACT	40%	53,2 °C
THY_R	<i>reverse</i>	TCMMCTCCTGAAGAAGCTAG	50%	57,3°C

Tab. 23: Rappresentazione nucleotidica della coppia di *primer* THY disegnati sul gene target COI.

Come mostrato in Figura 48, solamente la specie *Thunnus thynnus* contiene nella sua sequenza una timina in posizione 271 del gene COI, al contrario di *Thunnus obesus* e *Thunnus maccoyii* che contengono una citosina nella medesima posizione. Risulta quindi necessaria un'indagine secondaria in quanto i gruppi ascrivibili al set di primer oggetto di studio il seguente:

1. Sicuramente *Thunnus thynnus*
2. *Thunnus obesus* o *Thunnus maccoyii*

Per quanto riguarda il secondo gruppo derivante dall'analisi primaria, composto da *Thunnus albacares*, *Thunnus atlanticus*, *Thunnus tonggol*, *Thunnus alalunga* e *Thunnus orientalis*, sono state disegnate due diverse coppie di *primer*:

- Un set di *primer* (Tabella 11) denominato ALOR, per raggruppare *Thunnus alalunga* e *Thunnus orientalis* sulla base dello SNP in posizione 303 del gene CYT B come mostrato in Fig. 49.
- Una seconda coppia di *primer* chiamata ATTO (Tabella 12), con l'obiettivo di separare *Thunnus atlanticus* e *Thunnus tonggol* sulla base dello SNP in posizione 405 del gene CytB come mostrato in Fig. 50.

L'analisi in silico evidenzia quindi le seguenti possibilità basate sui polimorfismi osservati:
Con l'utilizzo di questi due coppie di *primer* per un'indagine secondaria potrebbe essere possibile separare il secondo gruppo in altri tre sottogruppi:

1. *Thunnus alalunga* o *Thunnus orientalis*
2. *Thunnus atlanticus* o *Thunnus tonggol*
3. *Thunnus albacares*

La specie *Thunnus albacares*, quindi potrebbe essere individuata indirettamente.

Riassumendo, lo studio in silico prevede, tramite l'utilizzo delle quattro coppie di primer disegnate, la possibilità di distinguere (Fig. 51):

- *Thunnus thynnus*, mediante l'utilizzo dei primer THY;
- *Thunnus albacares*, indirettamente attraverso lo studio dei risultati ottenuti utilizzando le altre coppie.
- *Thunnus obesus* o *Thunnus maccoyii* mediante l'utilizzo combinato dei primer DIS e THY;
- *Thunnus alalunga* o *Thunnus orientalis* mediante l'utilizzo combinato dei primer DIS e ALOR;
- *Thunnus atlanticus* o *Thunnus tonggol* mediante l'utilizzo dei primer combinato DIS e ATTO.

Per questi ultimi tre sottogruppi non è possibile fornire una caratterizzazione esatta di specie ma, attraverso lo studio della zona tipica di pesca, si riesce a risalire con una buona probabilità alla specie in esame.

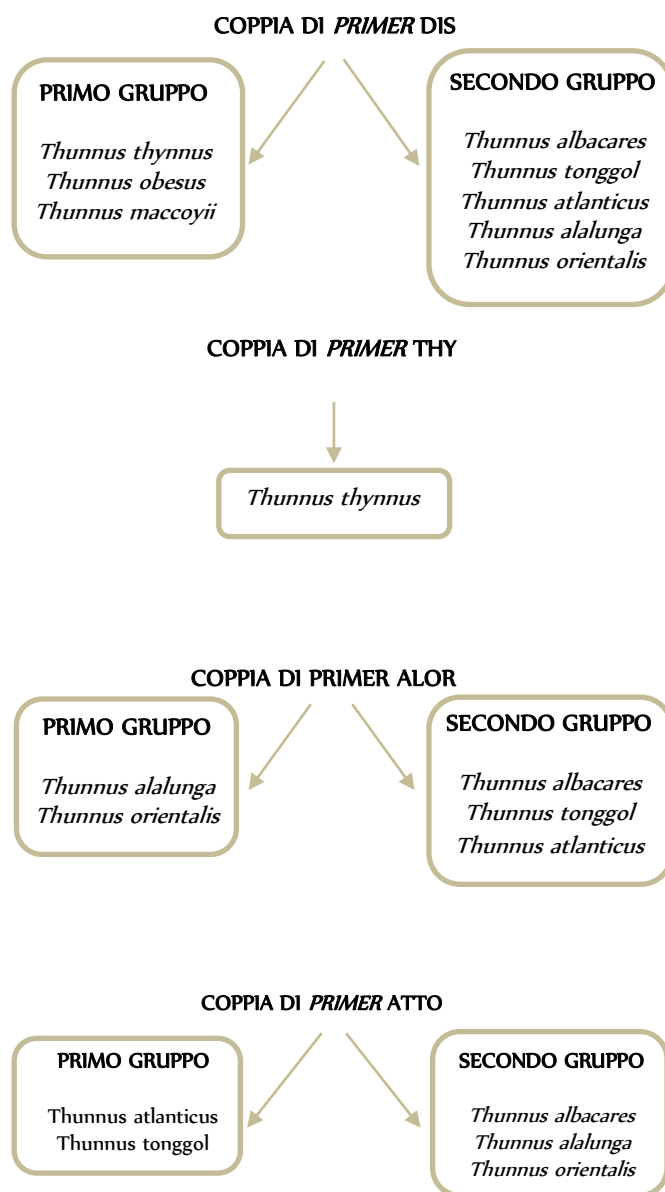


Fig. 51: Schema riassuntivo dei raggruppamenti di specie del genere *Thunnus* ottenibili secondo lo studio *in silico*

5.2.2. Test in vitro dei primer

Le prime analisi svolte per la messa a punto della metodica HRM sono state effettuate su un gruppo di campioni appartenenti al genere *Thunnus* precedentemente identificati mediante analisi morfologica attraverso le chiavi dicotomiche proposte dalla FAO. In alcuni casi l'identificazione morfologica è stata confermata mediante amplificazione e sequenziamento della regione COI come descritto nel capitolo 3.2.

Una problematica emersa durante questa fase del lavoro è stata l'impossibilità di reperire campioni per tutte le specie che compongono il genere *Thunnus*, in quanto esse hanno zone di cattura assai diversificate e alcune specie non arrivano sui mercati italiani. Questo limite ha reso problematica la valutazione di alcuni set di primer disegnati in silico.

5.2.2.1. *Quantificazione e normalizzazione del DNA*

Dopo l'estrazione dei vari campioni, si è proceduto alla quantificazione di ciascuno di essi mediante Nanodrop. Per la quantificazione del *dsDNA* (*strandouble DNA*) lo strumento analizza il campione ad una lunghezza d'onda di 260 nm; il campione viene quantificato in ng/μl e l'intervallo considerato è compreso tra i 20 – 80 ng/μl. Lo strumento fornisce un indice del grado di purezza del campione calcolando il rapporto delle assorbanze lette a 260 nm e a 280 nm. Un valore di questo rapporto tra 1,61 – 2,01 indica una buona qualità dell'estratto mentre valori superiori a 2 indicano un'elevata concentrazione proteica e valori inferiori a 1,6 indicano elevata contaminazione da RNA.

Dopo la misurazione si è proceduto a diluire tutti i campioni ad una concentrazione di 10 ng/μl, quantità ritenuta ottimale per l'analisi HRM in quanto permette di ridurre al minimo eventuali effetti inibitori dati dalla matrice e al contempo fornisce una buona uniformità dei risultati^[50].

5.2.2.2. *Test di temperatura di annealing e di clustering*

Di seguito vengono riportati i campioni utilizzati per i test preliminari volti alla determinazione della temperatura di annealing ottimale per i primer disegnati (Tab. 26).

Per questa prima serie di test sono stati utilizzati esclusivamente campioni appartenenti al genere *Thunnus* per poter valutare la congruenza tra i raggruppamenti osservati in silico e i risultati in vitro.

Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato e la reazione è stata condotta utilizzando la *mix* di reazione descritta in Tab. 27, con il profilo termico riportato in Tab. 28 e con la rispettiva rappresentazione grafica raffigurata in Fig. 52, in un volume totale di 20 µl.

CAMPIONI	GENERE	SPECIE	DENOMINAZIONE COMMERCIALE
CAMPIONE 1	<i>Thunnus</i>	<i>alalunga</i>	Tonno alalunga
CAMPIONE 2	<i>Thunnus</i>	<i>alalunga</i>	Tonno alalunga
CAMPIONE 3	<i>Thunnus</i>	<i>alalunga</i>	Tonno alalunga
CAMPIONE 4	<i>Thunnus</i>	<i>alalunga</i>	Tonno alalunga
CAMPIONE 5	<i>Thunnus</i>	<i>alalunga</i>	Tonno alalunga
CAMPIONE 6	<i>Thunnus</i>	<i>thynnus</i>	Tonno rosso
CAMPIONE 7	<i>Thunnus</i>	<i>albacares</i>	Tonno pinne gialle
CAMPIONE 8	<i>Thunnus</i>	<i>sp.</i>	Tonno

Tab. 26: Campioni analizzati per la determinazione della migliore temperatura di annealing.

REAGENTE	VOLUME SINGOLA REAZIONE
H ₂ O ultrapura sterile	4,8 µl
Precision Melt Supermix	10 µl
<i>Primer</i> Forward	0,1 µl
<i>Primer</i> Reverse	0,1 µl
DNA estratto	5 µl
Concentrazione finale	20 µl

Tab. 27: mix di reazione utilizzata per i test dei primer

FASE	TEMPERATURA	TEMPO	CICLI
Attivazione polimerasi	95°C	2 minuti	1
Denaturazione	95°C	10 secondi	40
Appaiamento/estensione	T ₁ -T ₂ -T ₃	30 secondi	40
Analisi di <i>Melting</i>	60 °C – 90°C	10 secondi / <i>step</i>	1

Tab. 28: Profilo termico utilizzato per i test dei primer. Temperature di appaiamento testate (T₁;T₂;T₃): Primer DIS: 60; 62; 64 °C; Primer THY: 58; 60; 66 °C; primer ALOR: 56; 58; 60°C.

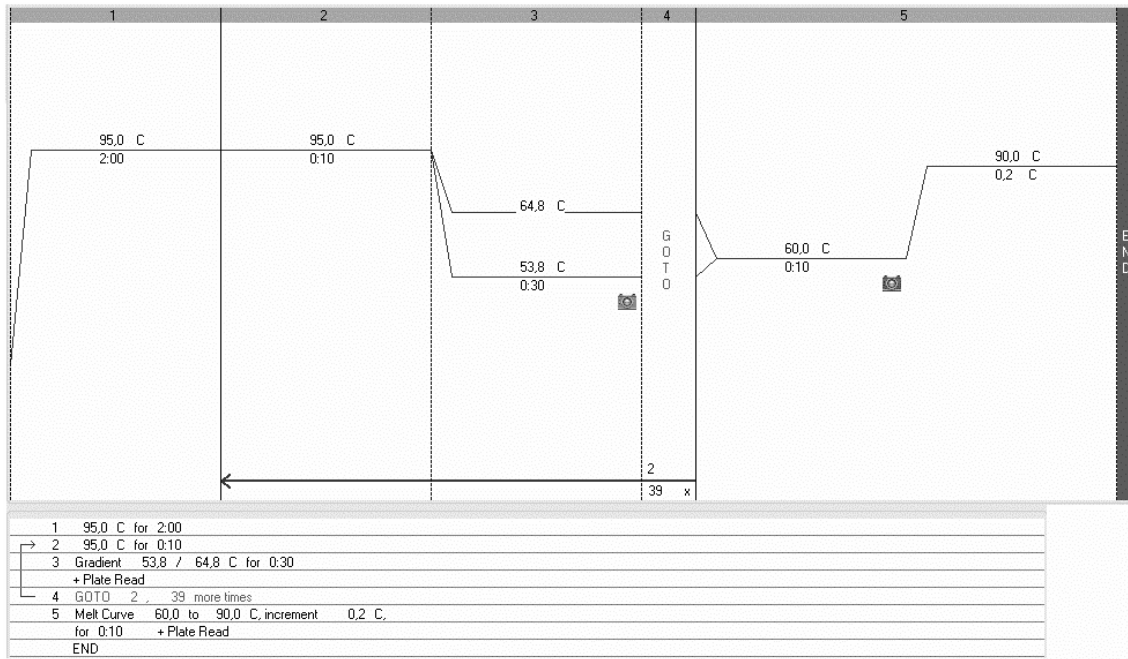


Fig. 52: profilo termico utilizzato per il test delle temperature dei primer disegnati in silico

Prima dell'analisi HRM le sequenze contenenti i polimorfismi sono state amplificate in presenza del fluoroforo EvaGreen ^[50]. Dopo l'amplificazione, i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad un aumento di temperatura progressiva e controllata da 60 a 90°C provocando la denaturazione della doppia elica mentre viene monitorata la variazione della quantità di fluorescenza così da generare una curva di dissociazione.

5.2.2.3. Test di specificità

Per la valutazione della specificità sono stati testati tre campioni appartenenti al genere *Thunnus* e altri ventuno campioni *non-Thunnus*, precedentemente identificati mediante metodo Barcoding e indagine morfologica. (Tab. 29).

CAMPIONI	GENERE	SPECIE	DENOMINAZIONE COMMERCIALE
CAMPIONE 1	<i>Sardina</i>	<i>pilchardus</i>	Sardina
CAMPIONE 2	<i>Salmo</i>	<i>trutta</i>	Trota
CAMPIONE 3	<i>Psettodes</i>	<i>belcheri</i>	Rombolino
CAMPIONE 4	<i>Sprattus</i>	<i>sprattus</i>	Spratto
CAMPIONE 5	<i>Platichthys</i>	<i>flesus</i>	Passera
CAMPIONE 6	<i>Synaptura</i>	<i>cadonati</i>	Sogliola oceanica
CAMPIONE 7	<i>Pontinus</i>	<i>ruhlii</i>	Scorfano corallino
CAMPIONE 8	<i>Scorpanea</i>	<i>scrofa</i>	Scorfano
CAMPIONE 9	<i>Silurus</i>	<i>glanis</i>	Siluro
CAMPIONE 10	<i>Branchiostegus</i>	<i>semifasciatus</i>	Tube zebra
CAMPIONE 11	<i>Dicentrarchus</i>	<i>punctatus</i>	Spigola puntata
CAMPIONE 12	<i>Anguilla</i>	<i>anguilla</i>	Anguilla
CAMPIONE 13	<i>Sparus</i>	<i>aurata</i>	Orata
CAMPIONE 14	<i>Pomatomus</i>	<i>saltator</i>	Serra
CAMPIONE 15	<i>Dentex</i>	<i>canariensis</i>	Dentice atlantico
CAMPIONE 16	<i>Merluccius</i>	<i>hubbsi</i>	Merluzzo atlantico
CAMPIONE 17	<i>Epinephelus</i>	<i>alexandrinus</i>	Cernia
CAMPIONE 18	<i>Tinca</i>	<i>tinca</i>	Tinca
CAMPIONE 19	<i>Clupea</i>	<i>harengus</i>	Aringa
CAMPIONE 20	<i>Priacanthus</i>	<i>sp.</i>	Catalufa
CAMPIONE 21	<i>Dicentrarchus</i>	<i>labrax</i>	Branzino
CAMPIONE 22	<i>Thunnus</i>	<i>alalunga</i>	Tonno alalunga
CAMPIONE 23	<i>Thunnus</i>	<i>thynnus</i>	Tonno rosso
CAMPIONE 24	<i>Thunnus</i>	<i>albacares</i>	Tonno pinne gialle

Tab. 29: Campioni analizzati nella prova di specificità.

Questi campioni sono stati testati con tutte le coppie di primer al fine di verificarne la specificità rispetto a specie non appartenenti al genere *Thunnus*.

5.3. RISULTATI

Test di temperatura di annealing e clustering

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti dai test preliminari sui campioni riportati in Tab. 26, con mix di reazione mostrata in Tab. 27 con profilo termico mostrato in Tab. 28 dei primer disegnati.

- Coppia di primer DIS

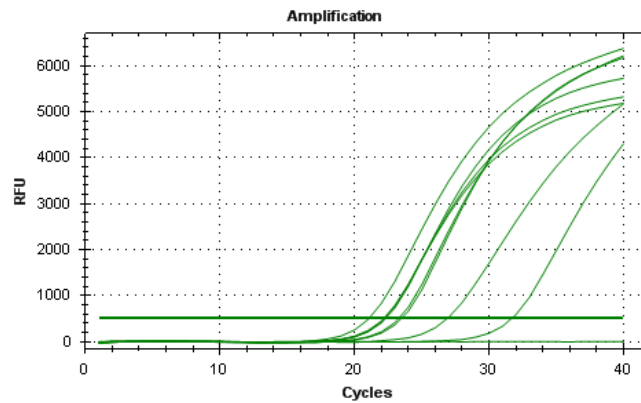


Fig. 53: Curve di amplificazione dei campioni analizzati ottenute dalla *Real-Time* PCR con coppia di *primer* DIS.

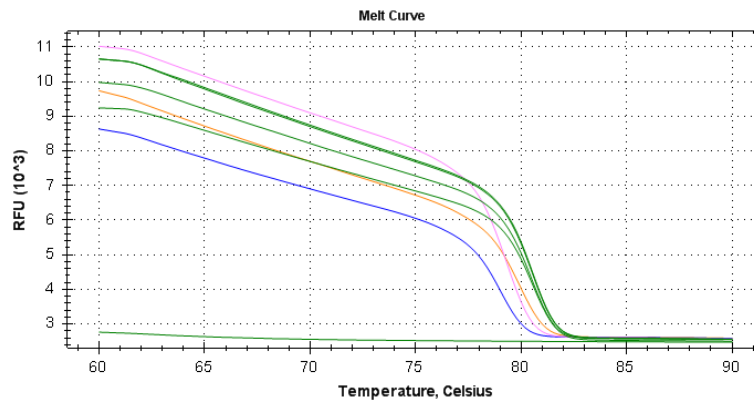


Fig. 54: Curve di dissociazione ottenute dalla *Real-Time* PCR con coppia di *primer* DIS: in VERDE le curve di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in ARANCIO la curva di dissociazione di *Thunnus* sp.; in ROSA la curva di dissociazione di *Thunnus thynnus*; in BLU la curva di dissociazione di *Thunnus albacares*

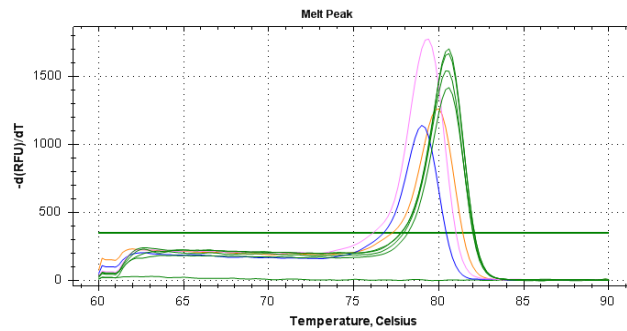


Fig. 55: Derivata delle curve di dissociazione ottenute dalla *Real-Time* PCR con coppia di *primer* DIS: in VERDE le derivate delle curve di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in ARANCIO la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus* sp.; in ROSA la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus thynnus*; in BLU la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus albacares*

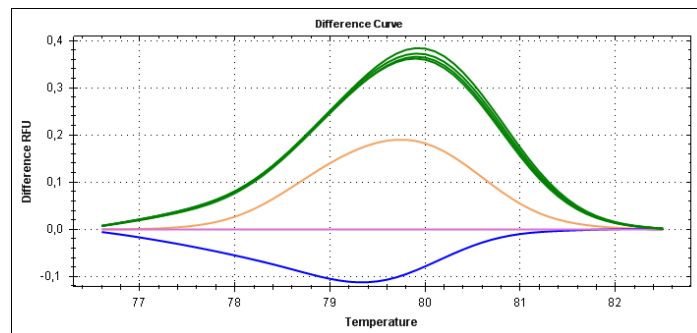


Fig. 56: Analisi ad alta risoluzione delle differenze degli andamenti delle curve di melting ottenute dalla *Real-Time* PCR con coppia di *primer* DIS: n VERDE le curve di Melting di *Thunnus alalunga*; in ARANCIO la curva di Melting di *Thunnus* sp.; in ROSA la curva di Melting di *Thunnus thynnus*; in BLU la curva di Melting di *Thunnus albacares*

I risultati non sono stati in accordo con lo studio in silico, il quale prevedeva la separazione delle specie di tonno in due gruppi formati rispettivamente da *T. thynnus*, *T. obesus* e *T. maccoyii* (gruppo 1), *T. albacares*, *T. tonggol*, *T. atlanticus*, *T. alalunga* e *T. orientalis* (gruppo 2).

Come mostrato nella fig. 56, *Thunnus alalunga* e *Thunnus albacares* presentano curve di dissociazione molto distanti tra di loro benché teoricamente dovessero rientrare nello stesso *cluster*, diverso da quello di *Thunnus thynnus*. È possibile inoltre notare, però, come vi sia una netta separazione tra la curva formata dai campioni di *Thunnus alalunga* e gli altri testati.

- Coppia di primer *THY*

Per questa coppia di primer stata condotta una prova innalzando di molto la temperatura di *annealing* dei primer, 8°C al di sopra dell'ottimale calcolato, e testando un campione per ogni specie appartenente al genere *Thunnus* disponibile e aggiungendo alcuni aspecifici.

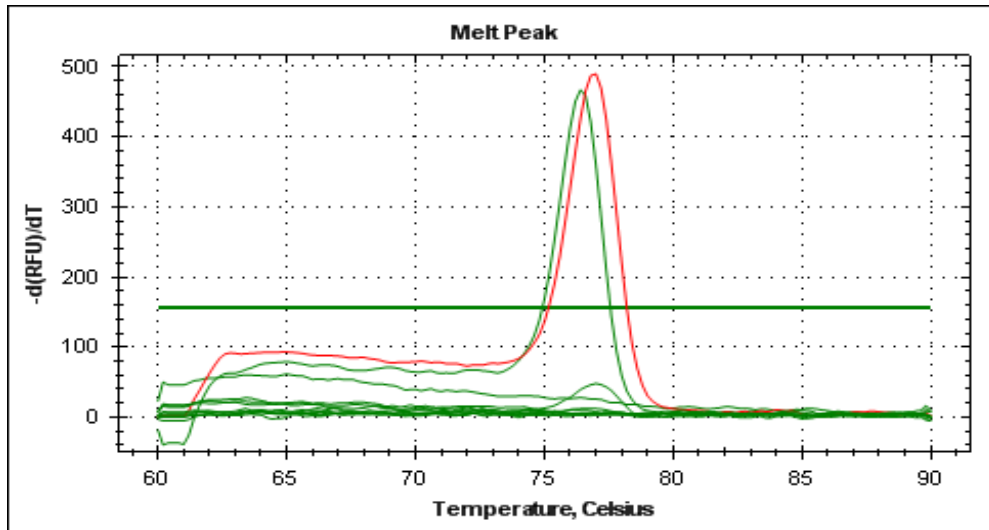


Fig. 57 Derivata delle curve di dissociazione ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di primer *THY*: in ROSSO le curva di dissociazione del campione di *Thunnus thynnus*; in VERDE le curva di dissociazione del campione di *Thunnus albacares*

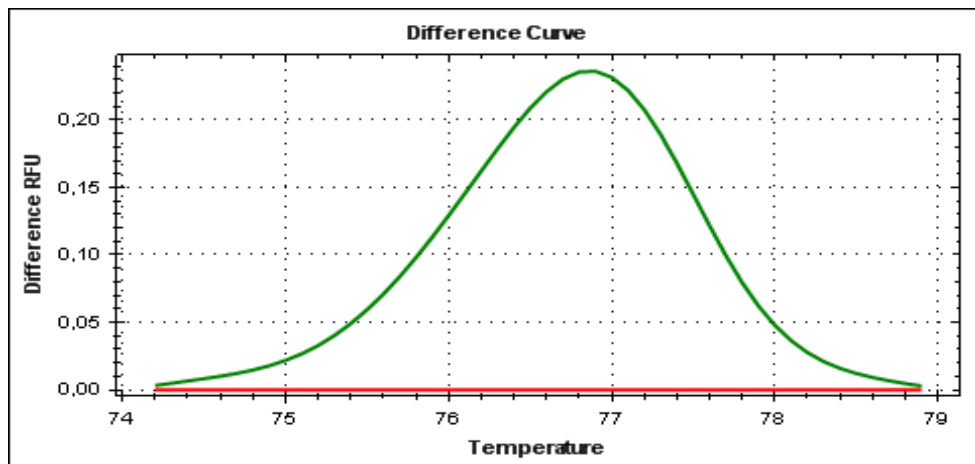


Fig. 58: Analisi ad alta risoluzione delle differenze degli andamenti delle curve di melting ottenute dalla *Real-Time* PCR con coppia di *primer THY*: in ROSSO le curva di Melting del campione di *Thunnus thynnus*; in VERDE le curva di Melting del campione di *Thunnus albacares*.

È possibile notare dalla Fig. 58 come in questo caso siano presenti solamente due amplificazioni relative ad un campione di *Thunnus thynnus* ed uno di *Thunnus albacares*, nettamente distinguibili tra loro tramite uno studio HRM Fig 46).

- *Coppia di primer ALOR*

Nelle Figg. 59 e 60 sono rappresentate, rispettivamente, le curve di dissociazione e la derivata delle curve di dissociazione dei campioni analizzati che hanno subito amplificazione durante la PCR *Real-time*. È possibile notare come la coppia di *primer* ALOR, per quanto possibile visto l'esiguo numero di esemplari testati, abbia fornito gli stessi risultati attesi *in silico*, con l'amplificazione specifica della specie *Thunnus alalunga* e un'ottima clusterizzazione delle curve di dissociazione (Fig. 61).

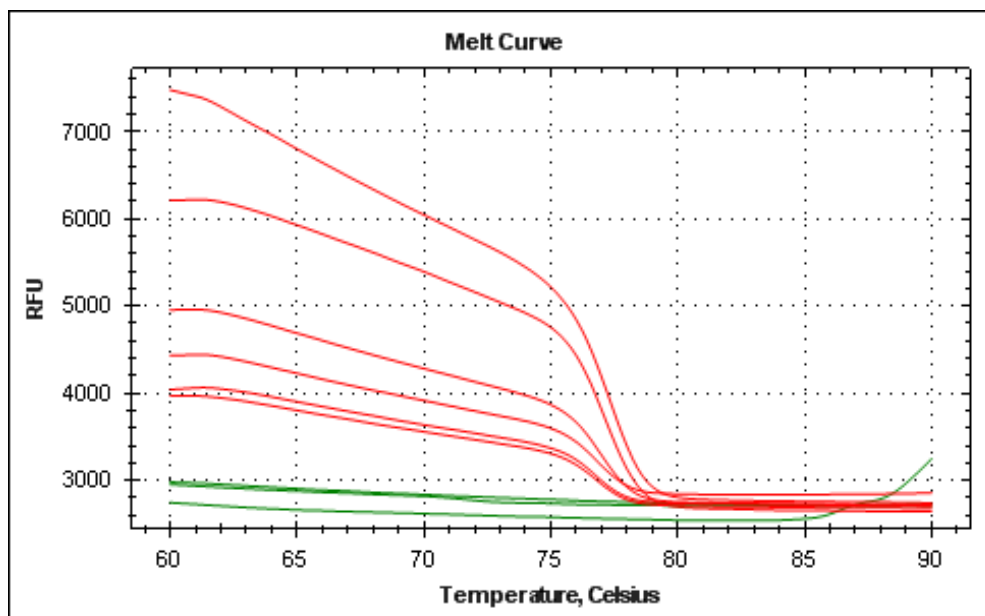


Figura 59. Curve di dissociazione ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di primer ALOR: in ROSSO le curve di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in VERDE campioni di *Thunnus thynnus* e *Thunnus albacares* che non hanno subito amplificazione

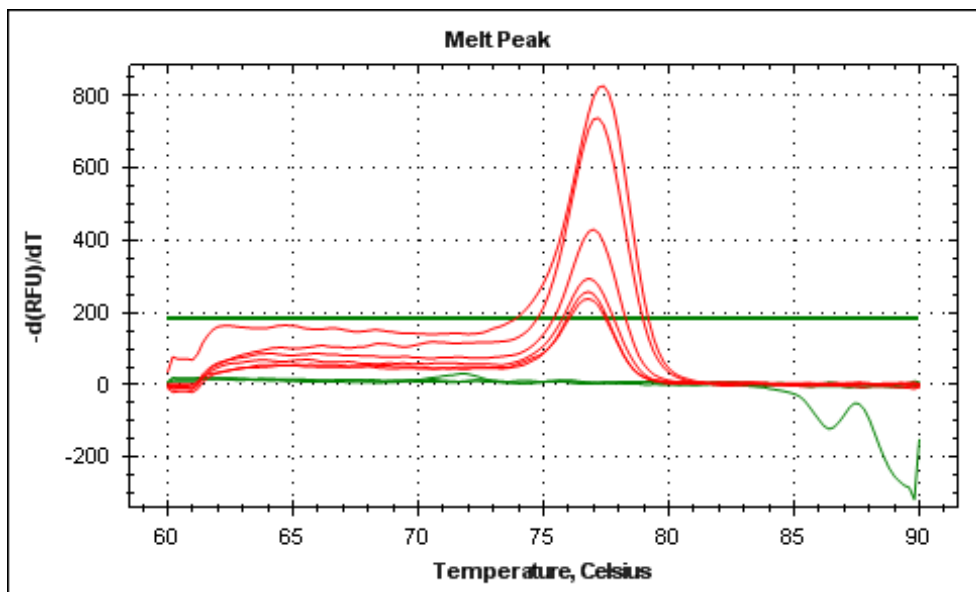


Fig. 60: Derivate delle curve di dissociazione ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di primer ALOR: in ROSSO le derivate delle curve di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in VERDE campioni di *Thunnus thynnus* e *Thunnus albacares* che non hanno subito amplificazione

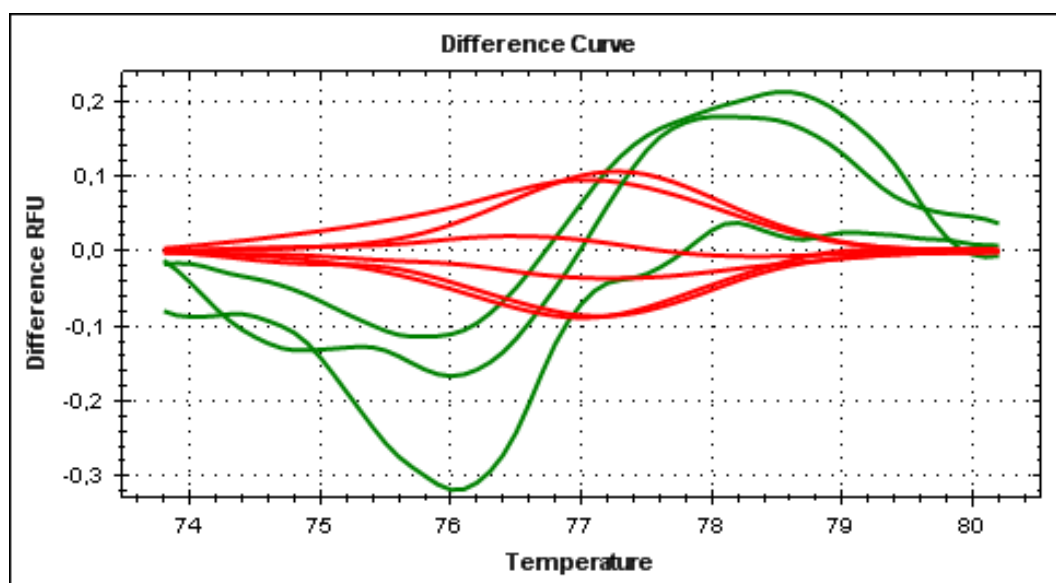


Fig. 61: Analisi ad alta risoluzione delle differenze degli andamenti delle curve di melting ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di primer ALOR: in ROSSO le curve di Melting di *Thunnus alalunga*; in VERDE la curva di Melting di *Thunnus thynnus*, *Thunnus albacares* e il campione di negativo

Test di specificità

Di seguito vengono riportati i risultati delle prove di specificità effettuate per tutte le coppie di primer disegnate sul panel di campioni riportato in Tab. 29.

- Coppia di primer DIS

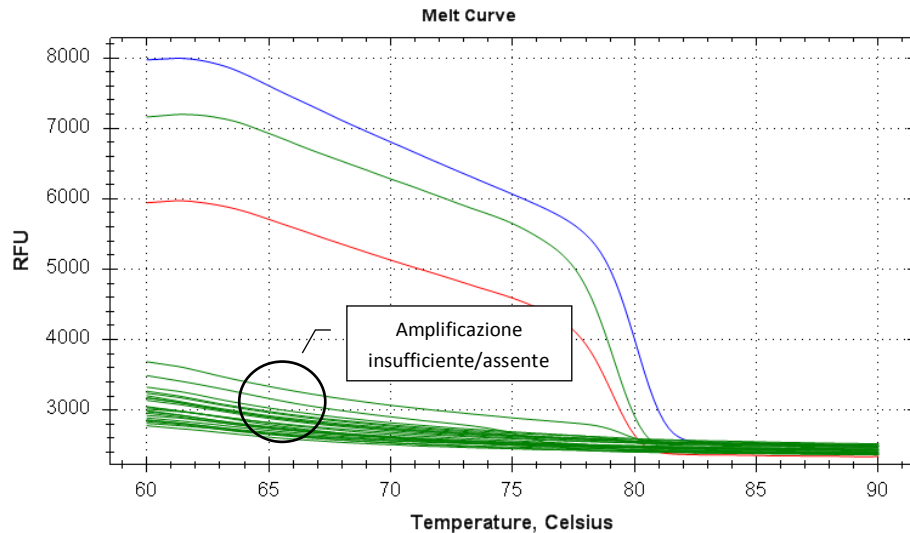


Fig. 62: Curve di dissociazione ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di *primer DIS*: in BLU la curva di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in VERDE la curva di dissociazione di *Thunnus thynnus*; in ROSSO la curva di dissociazione di *Thunnus albacares*

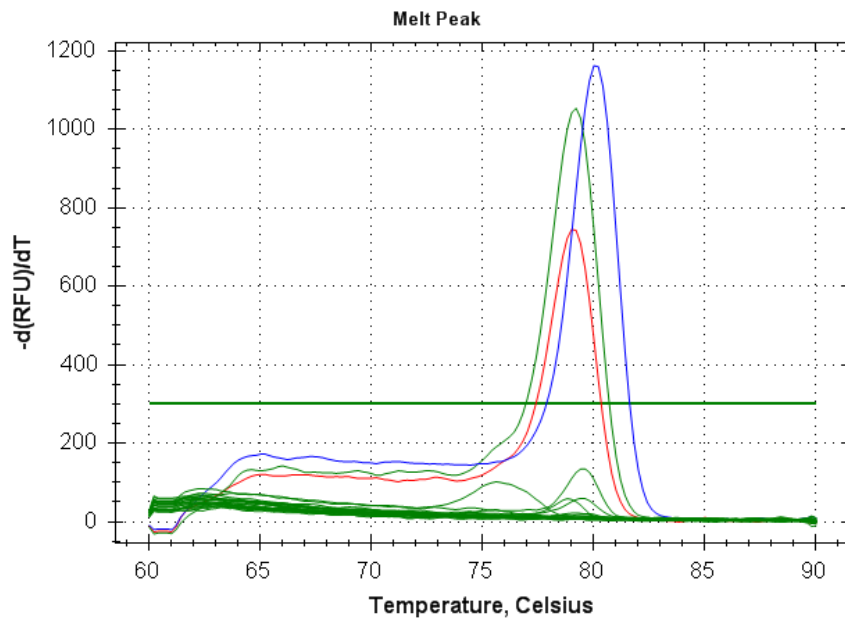


Fig. 63: Derivata delle curve di dissociazione ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di primer DIS: in BLU la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in VERDE la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus thynnus*; in ROSSO la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus albacares*

Nelle Figg. 62 e 63 sono rappresentate le curve di dissociazione dei campioni analizzati. È possibile notare come solamente le tre specie appartenenti al genere *Thunnus* siano state amplificate: in particolare *Thunnus alalunga*, *Thunnus thynnus* e *Thunnus albacares*. Tutte le altre 21 specie in analisi hanno dato risultato negativo di amplificazione. Anche il controllo negativo di PCR, inserito in ogni prova, non ha dato amplificazione, a dimostrazione dell'assenza di contaminanti.

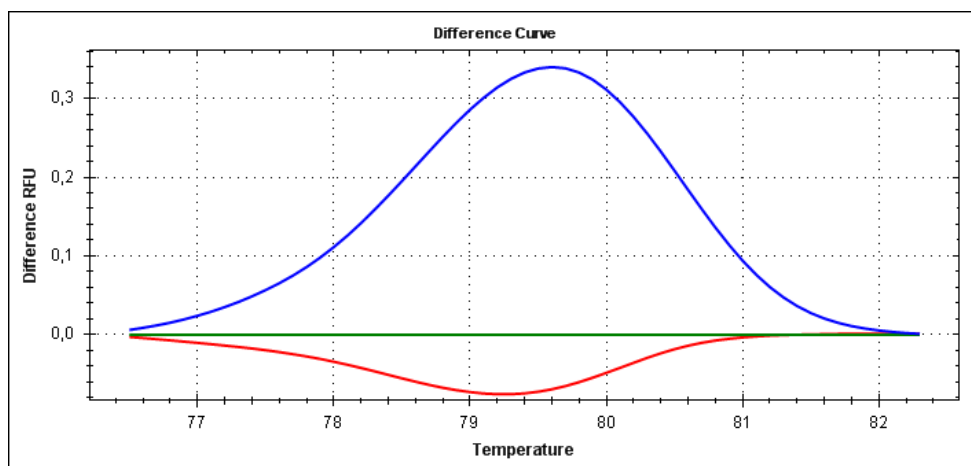


Fig.64 Analisi ad alta risoluzione delle differenze degli andamenti delle curve di melting ottenute dalla *Real-Time* PCR con coppia di *primer* DIS: in BLU la curva di *Melting* di *Thunnus alalunga*; in VERDE la curva di *Melting* di *Thunnus thynnus*; in ROSSO la curva di *Melting* di *Thunnus albacares*

Le curve di *Melting* ad alta risoluzione di tre specie di genere *Thunnus* rappresentate in Fig. 64 mostrano come *Thunnus alalunga* presenti una curva di *Melting* nettamente distinta rispetto le altre due specie; al contrario *Thunnus albacares* e *Thunnus thynnus* presentano curve di dissociazione più simili tra di loro anche se non completamente identiche. Altra cosa da sottolineare è come la coppia di *primer* DIS non abbia dato i risultati attesi in silico per quanto riguarda la capacità di dividere in due gruppi distinti le diverse specie, in quanto si supponeva che *Thunnus alalunga* e *Thunnus albacares* si separassero nettamente da *Thunnus thynnus* in un unico gruppo, cosa che in pratica non è avvenuta.

- Coppia di primer THY

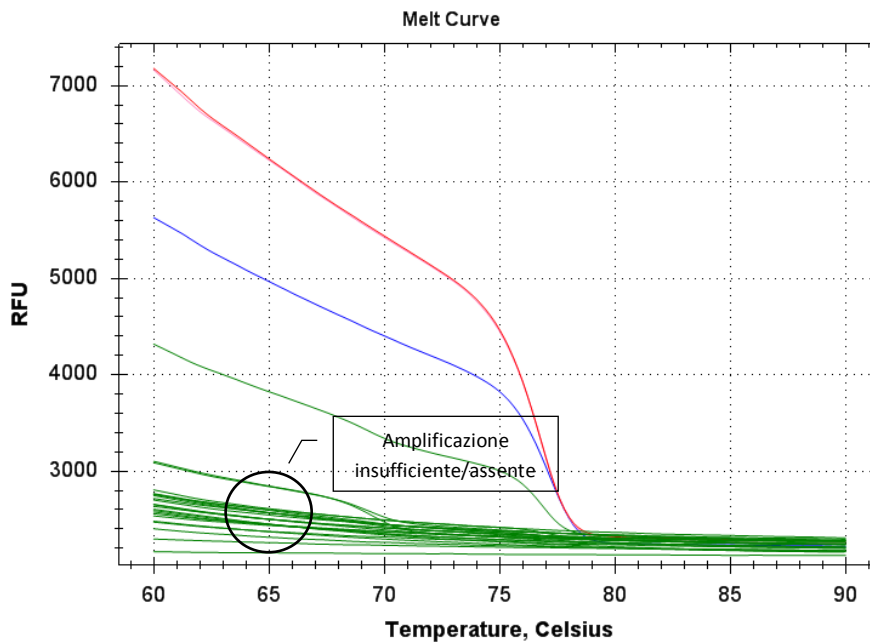


Fig. 65: Curve di dissociazione ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di primer THY: in BLU la curva di dissociazione di *Thunnus albacares*; in VERDE la curva di dissociazione di un *non-Thunnus*; in ROSSO la curva di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in ROSA la curva di dissociazione di *Thunnus thynnus*

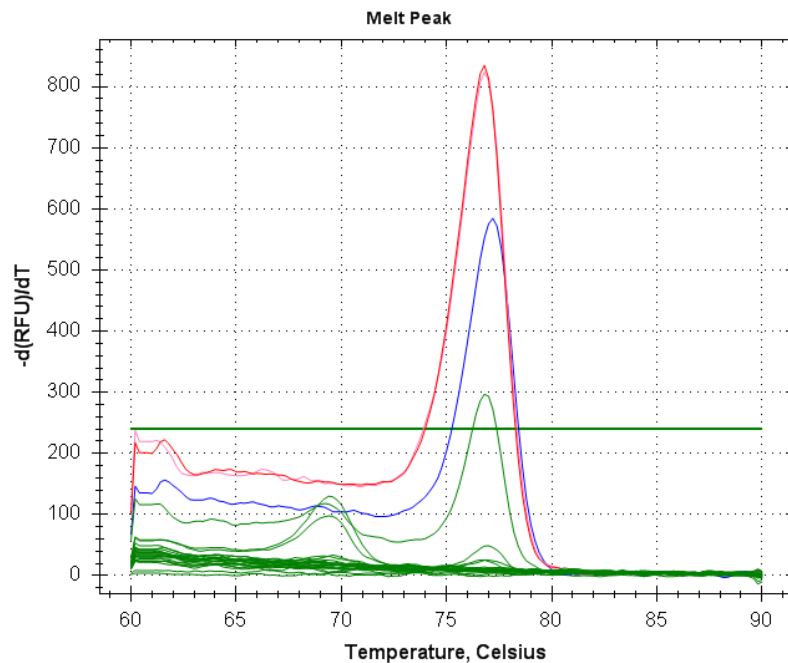


Fig. 66: Derivata delle curve di dissociazione ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di primer THY: in BLU la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus albacares*; in VERDE la derivata della curva di dissociazione di un *aspecifico*; in ROSSO la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in ROSA la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus thynnus*

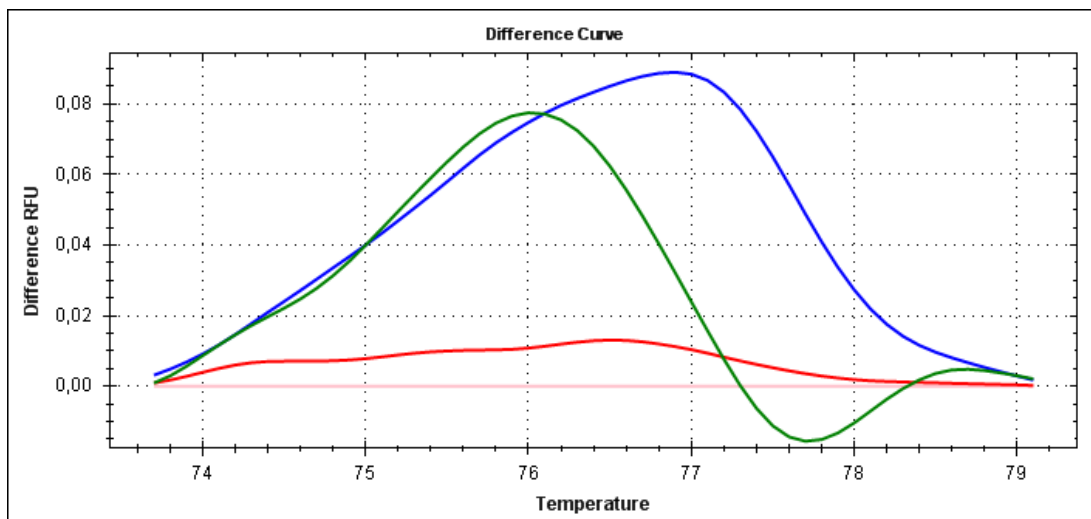


Fig. 67: Analisi ad alta risoluzione delle differenze degli andamenti delle curve di melting ottenute dalla *Real-Time* PCR con coppia di *primer* THY: in BLU la curva di melting di *Thunnus albacares*; in VERDE la curva di melting di *Platichthys flesus*; in ROSSO la curva di melting di *Thunnus alalunga*; in ROSA la curva di melting di *Thunnus thynnus*

Nelle Figg. 65 e 66 sono rappresentate, rispettivamente, le curve di dissociazione e la derivata delle curve di dissociazione dei campioni analizzati che hanno subito amplificazione durante la PCR Real-time. La Fig. 67 mostra come tutti e tre i membri del genere *Thunnus* vengono amplificati ed è possibile notare una netta distinzione fra le curve di *Thunnus thynnus* e di *Thunnus albacares*.

Thunnus thynnus e *Thunnus alalunga* invece possiedono delle curve di dissociazione molto simili, questo a dimostrazione della non perfetta specificità dei primer. Infine, si evidenzia un'amplificazione anomala di un campione appartenente alla specie *Platichthys flesus* (passera), la quale tuttavia possiede una curva di dissociazione completamente differente da quelle dei campioni appartenenti al genere *Thunnus* e per questo facilmente distinguibile.

Accoppiando quindi i risultati ottenibili con coppia di *primer* DIS con quelli ottenibili con i *primer* THY si riescono ad identificare correttamente *Thunnus thynnus*, *Thunnus albacares* e *Tunnus alalunga* (Fig. 68).

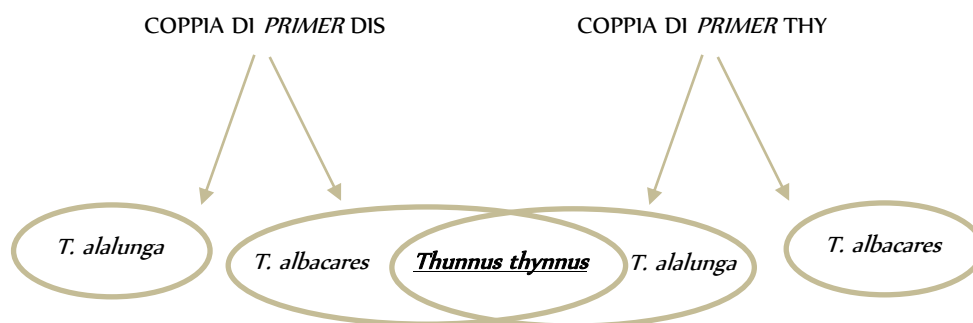


Fig. 68: Schema riassuntivo dei raggruppamenti di specie del genere *Thunnus* ottenuti in vitro mediante l'utilizzo delle coppie di primer DIS e THY.

- *Coppia di primer ALOR*

Nelle Figg. 69 e 70 sono rappresentate, rispettivamente, le curve di dissociazione e la derivata delle curve di dissociazione dei campioni analizzati che hanno amplificato durante la PCR Real-time. La prova di specificità condotta sulla coppia di primer ALOR ha prodotto dei risultati soddisfacenti.

Benché sia possibile notare dalla Fig. 71 la presenza di amplificazioni di campioni *non-Thunnus* (*Platichthys flesus*, *Tinca tinca*, *Merluccius hubbsi*, *Epinephelus alexandrinus* e *Anguilla anguilla*) e l'amplificazione del campione di *Thunnus albacares*, l'analisi HRM della curva di melting appartenente al campione di *Thunnus alalunga* mostra un andamento chiaramente distinguibile dalle altre.

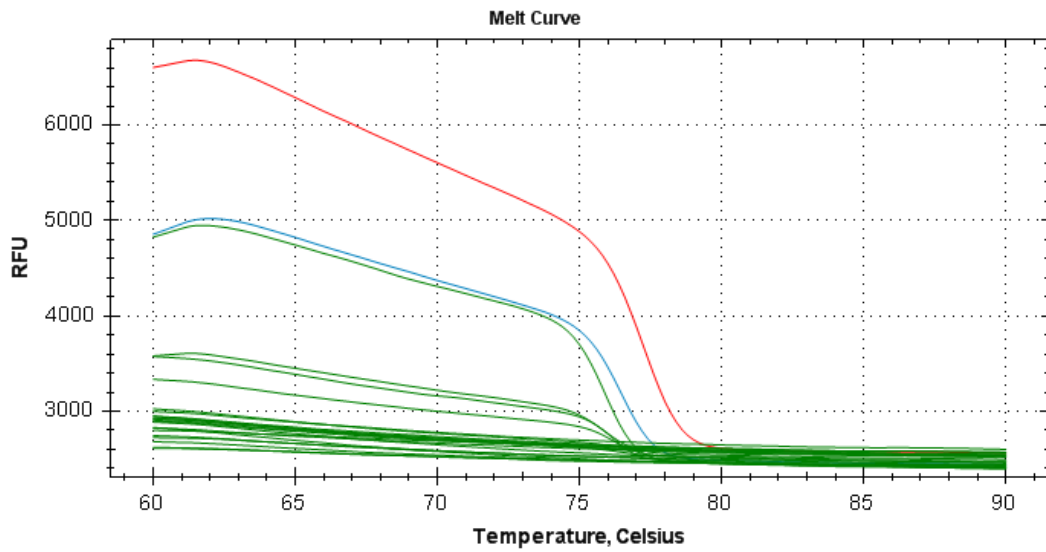


Fig. 69: Curve di dissociazione ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di primer ALOR: in ROSSO la curva di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in AZZURRO la curva di dissociazione di *Thunnus thynnus*; in VERDE le curve di dissociazione di campioni *non-Thunnus*

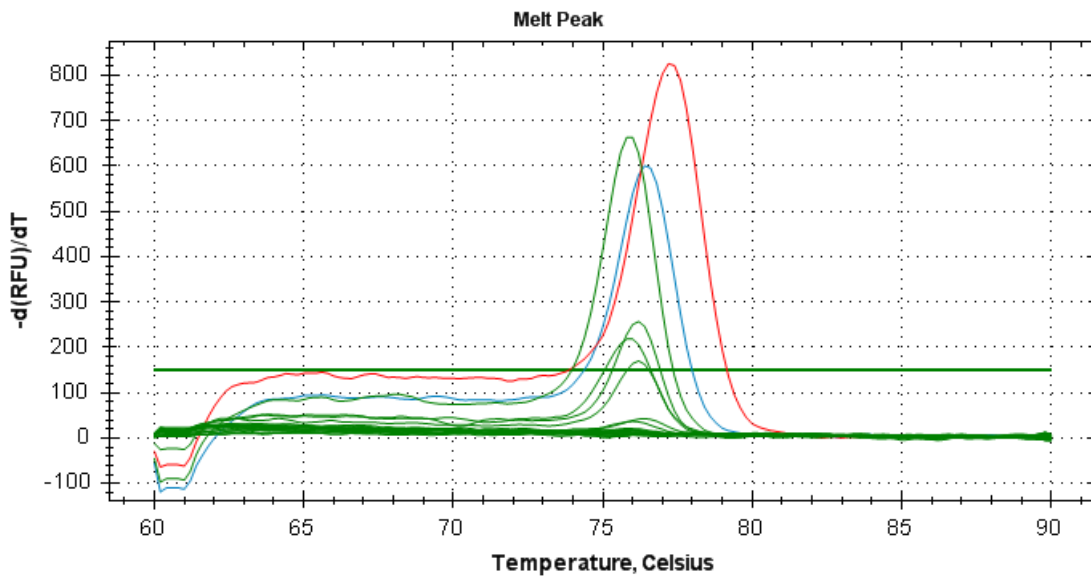


Fig. 70: Derivata delle curve di dissociazione ottenute dalla Real-Time PCR con coppia di primer ALOR: in ROSSO la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus alalunga*; in AZZURRO la derivata della curva di dissociazione di *Thunnus thynnus*; in VERDE le derivate delle curve di dissociazione di campioni *non-Thunnus*

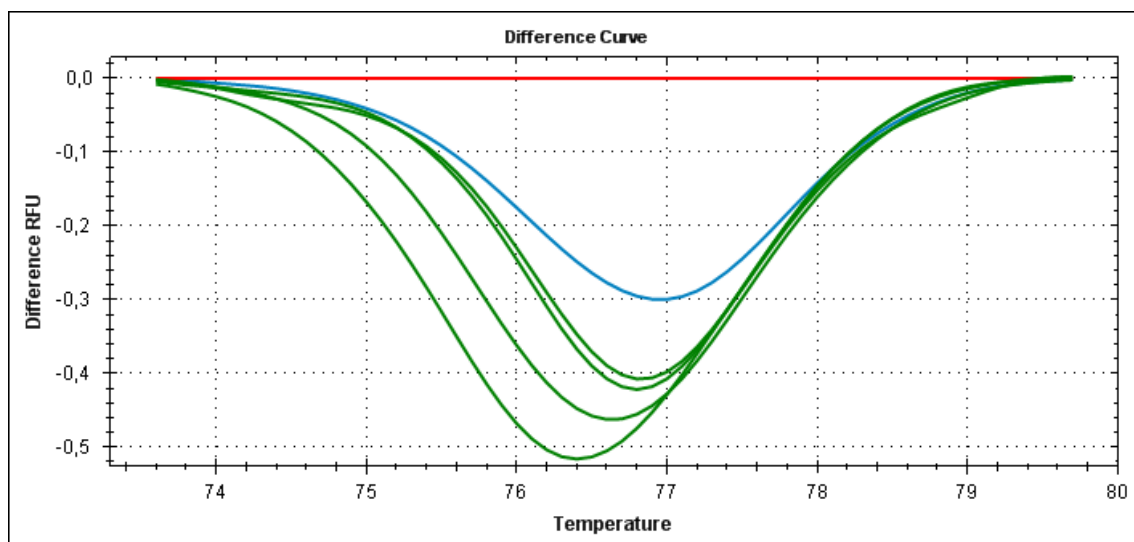


Figura 59. Analisi ad alta risoluzione delle differenze degli andamenti delle curve di melting ottenute dalla *Real-Time* PCR con coppia di *primer* ALOR: in ROSSO la curva di Melting del genere *Thunnus alalunga*; in AZZURRO la curva di Melting di *Thunnus thynnus*; in VERDE le curve di Melting di campioni *non-Thunnus*

5.4. DISCUSSIONE

In questo lavoro è stato affrontato il problema dell'identificazione di specie di campioni appartenenti al genere *Thunnus* mediante l'utilizzo di un'analisi post-PCR che prevede lo studio delle curve di melting ad alta risoluzione.

Questa metodica, già utilizzata da Fitzcharles nel 2012^[51] per l'identificazione di specie appartenenti al genere *Macrourus*, ha la potenzialità di evidenziare differenze puntiformi tra due sequenze grazie al diverso andamento del decadimento della fluorescenza conseguente ad un innalzamento controllato della temperatura.

Il disegno di 4 coppie di primer ha permesso, mediante la combinazione dei risultati ottenuta, di identificare *Thunnus thynnus*, *Thunnus albacares*, e *Thunnus alalunga*, risolvendo così il problema dell'identificazione delle due specie di maggior valore commerciale.

La coppia di *primer* ALOR ha fornito i risultati attesi *in silico*, infatti gli unici campioni che hanno subito amplificazione sono stati quelli appartenenti alla specie *Thunnus alalunga*. La coppia di *primer* ATTO è stata testata solo *in silico*.

Bisogna tuttavia considerare che la messa a punto di analisi diagnostiche scientificamente robuste sono spesso limitate dalla ridotta disponibilità del materiale biologico su cui

effettuare le prove necessarie. In questo caso particolare, la mancanza di materiale di riferimento per alcune specie non ha permesso di portare a termine il set-up del metodo, fornendo però dati incoraggianti riguardanti una metodica poco sfruttata ma con potenzialità e caratteristiche che la rendono ideale per gli scopi diagnostici oggetto di questo lavoro.

Grazie ad un approfondito studio *in silico* è stato possibile disegnare quattro coppie di *primer* denominate rispettivamente DIS, THY, ALOR e ATTO che permettessero di condurre una “indagine primaria” mediante l’utilizzo della coppia di *primer* DIS, dividendo le otto specie appartenenti al genere *Thunnus* in due gruppi distinti: *T. thynnus*, *T. obesus* e *T. maccoyii* per il primo gruppo; *T. albacares*, *T. tonggol*, *T. atlanticus*, *T. alalunga* e *T. orientalis* per il secondo gruppo. Mediante l’utilizzo delle restanti coppie di *primer* disegnate, THY, ALOR e ATTO, è stata progettata una “indagine secondaria” che permettesse la suddivisione dei due gruppi principali in sottogruppi. L’intersezione dei risultati di tutte queste prove, secondo gli studi *in silico*, riesce a suddividere le otto specie e ad identificarle correttamente.

È comunque necessario precisare che le simulazioni realizzate “*in silico*” presentano delle limitazioni dovute alle inevitabili semplificazioni adottate nel modello fisico-matematico utilizzato per il calcolo virtuale del risultato. Una problematica sorta durante questo lavoro di tesi è stata l’impossibilità di reperire campioni per tutte le specie che compongono il genere *Thunnus*, in quanto esse possiedono zone di cattura assai diversificate e alcune specie non arrivano sui mercati italiani.

Le prove effettuate dimostrano infatti come le coppie di *primer* abbiano risposto in maniera diversa rispetto ai risultati attesi. In particolare la coppia di *primer* DIS non ha prodotto una netta divisione in due gruppi delle diverse specie. Al contrario le due specie che hanno formato un *cluster* sono state *Thunnus thynnus* e *Thunnus albacares*. Anche la coppia di *primer* THY non ha dato i risultati attesi *in silico* in quanto vi sono amplificazioni aspecifiche che dimostrano la mancata esclusività di questa coppia di *primer* nel riconoscere la specie *Thunnus thynnus*.

6. CONCLUSIONI

Il panorama ittico rappresenta un settore molto importante nel contesto produttivo alimentare, sia per l'aspetto economico sia per quello nutrizionale. Negli ultimi anni si osserva infatti un incremento dei consumi dovuto alla crescente offerta di nuove specie ittiche che si presentano sul mercato e per la continua innovazione nei settori della produzione e della distribuzione. I consumatori che si recano ai banchi nei supermercati per acquistare del pesce potrebbero imbattersi in prodotti freschi ma d'incerta provenienza, non conformi alla legislazione e con assenza di etichettatura. Viene definita frode per sostituzione "*aliud pro alio*" l'utilizzo di specie ittiche di minor pregio sostituite con specie di elevato valore commerciale, le quali sono morfologicamente simili, allo scopo di ottenere un guadagno maggiore. Questa tipologia di frode si può riscontrare su qualsiasi prodotto ittico, a partire dal prodotto intero fresco fino ad arrivare al prodotto più lavorato, come tranci o filetti.

A livello puramente normativo, in ambito di tracciabilità del prodotto, il Regolamento (CE) N. 2065/2001, nel suo articolo 8 recita: "le informazioni richieste per quanto riguarda la denominazione commerciale, il metodo di produzione e la zona di cattura devono essere disponibili ad ogni stadio di commercializzazione della specie interessata. Queste informazioni e la denominazione scientifica della specie di cui si tratta sono fornite mediante l'etichettatura o l'imballaggio del prodotto oppure mediante un qualsiasi documento commerciale di accompagnamento della merce, compresa la fattura".

Sebbene non vi siano ad oggi normative specifiche che indichino la metodica del Barcoding come elettiva per la sorveglianza sulle frodi ittiche, i numerosi riscontri scientifici a livello nazionale e internazionale rendono questo approccio adatto ad essere utilizzato come riferimento standard dell'ambito delle identificazione di specie^[51,52,53,54].

Il limite principale di questo metodo è la necessità di disporre di sequenze di riferimento "certe" con cui confrontare i risultati del sequenziamento dei campioni in analisi. Questo passaggio può creare notevoli problemi qual'ora si presentassero degli errori all'interno dei database presi a riferimento oppure se il campione in esame appartenga ad una specie poco studiata e di conseguenza poco rappresentata nei database.

Un'altra limitazione tecnica relativa all'applicazione del metodo Barcoding si riscontra quando vengono sottoposti ad analisi campioni appartenenti a gruppi di specie geneticamente molto simili, nel qual caso risulta impossibile attribuire il corretto *taxon*.

Alla luce di ciò la costruzione di un database locale di sequenze è stato il punto di partenza di questo lavoro di Tesi.

La rigorosa scelta dei campioni considerati idonei a popolare il database, la raccolta dei dati, la creazione di schede informative e l'analisi delle sequenze ha permesso di creare uno strumento robusto e utile per chiunque necessiti di svolgere analisi di Barcoding per l'identificazione di specie ittiche.

L'esecuzione del ring trial ha permesso di mettere in luce uno dei problemi sopra descritti. In particolare, uno dei laboratori ha fornito un esito errato sulla base dell'output fornito dal database GenBank, il quale contiene, per la sequenza in esame, un'unica sequenza errata che si posiziona però al primo posto per percentuale di similarità e query coverage. L'attività di sorveglianza, condotta mediante metodo Barcoding, ha permesso di mettere in luce una percentuale di frodi maggiore in alcuni gruppi di specie (molluschi cefalopodi, cernie e gadiformi), mentre una percentuale minore è stata riscontrata nei pesci piatti, i quali hanno però rappresentato la percentuale maggiore dei campioni raccolti.

Durante questa attività non è stato possibile valutare le frodi riguardanti i campioni appartenenti al genere *Thunnus*, in quanto, come descritto precedentemente, la metodica del Barcoding non è risolutiva per esemplari facenti parte di gruppi geneticamente molto simili.

È stato quindi condotto uno studio approfondito volto all'analisi delle curve di melting ad alta risoluzione. L'analisi in silico condotta e gli studi preliminari in vitro hanno mostrato come questa tecnologia permetta, attraverso il disegno di 4 coppie di primer, di ottenere la caratterizzazione delle tre specie commercialmente più rilevanti presenti sul mercato nazionale. Sicuramente sarà necessario continuare ad approfondire lo studio, cercando di reperire campioni di riferimento verificati di certa origine delle specie mancanti e testando successivamente il metodo su un numero più ampio di campioni provenienti dai mercati nazionali in maniera tale da rendere la metodica scientificamente e legalmente robusta.

Un altro caso di studio trattato in questo lavoro è legato allo sviluppo di metodi diagnostici rapidi alternativi al Barcoding è quello condotto per il riconoscimento della specie *Octopus vulgaris*. Questo mollusco cefalopode, commercializzato e apprezzato ormai in tutto il mondo, viene spesso sostituito con altri cefalopodi dei generi *Octopus* e *Amphioctopus* di valore commerciale inferiore in quanto l'identificazione morfologica di questa famiglia (*Octopodidae*) è molto complessa.

Ad oggi sono pochi gli studi volti all'implementazione dei metodi diagnostici per l'identificazione di *Octopus vulgaris*, a dimostrazione del fatto che la necessità di approfondire la sorveglianza su questa specie è molto recente, concomitante con l'aumentare delle importazioni e con la diversificazione delle specie commercializzate.

Per questo particolare caso di studio si è scelto di mettere a punto una metodica di PCR *Real-Time* che permettesse di distinguere rapidamente *Octopus vulgaris* dalle altre specie di cefalopodi, con particolare attenzione alle specie morfologicamente più simili con cui è più probabile la frode per sostituzione.

L'analisi dei 77 campioni utilizzati per l'indagine di mercato ha messo in luce la necessità di continuo aggiornamento delle banche dati di sequenze in quanto è stata riscontrata una lacuna per quanto riguarda la specie *Octopus mebranaceus* dovuta alla completa assenza di sequenze COI di riferimento.

L'approccio identificativo, avendo a disposizione esemplari interi, è stato in primo luogo di carattere morfologico e, in seconda battuta, mediante l'amplificazione e il sequenziamento di un tratto di gene codificante per il Citocromo B.

Questo ha permesso di avere una ragionevole certezza nell'attribuzione di specie, riuscendo così ad ottenere le sequenze di COI necessarie a colmare il gap.

L'analisi di mercato ha rivelato un'alta percentuale di frode per quanto riguarda *Octopus vulgaris*. Su 77 prodotti analizzati infatti 41 dichiaravano di contenere *Octopus vulgaris* o Polpo mentre le analisi hanno rivelato che 21 di questi (51,2%) in realtà contenevano altre specie in modo particolare *Octopus cyanea*.

Il Barcoding inoltre ha permesso di rilevare la presenza di una forte percentuale di *mislabelling* ossia di errore di etichettatura dei prodotti.

L'attività di sorveglianza condotta sia a livello generale sul territorio nazionale che, in maniera più contenuta, nel caso di studio di *Octopus vulgaris*, ha portato alla luce una preoccupante tendenza alla frode nel settore ittico, dovuta tal volta alla ricerca di maggiori profitti, tal volta alla mancanza di competenza o di formazione, alla cattiva gestione e alla scarsa considerazione del sistema di tracciabilità che porta i commercianti a porre poca attenzione all'etichettatura dei loro prodotti.

Risulta quindi evidente la necessità a livello nazionale ed europeo di una costante sorveglianza dei prodotti a tutela del consumatore sia dal punto di vista economico che dal punto di vista sanitario.

L'approccio proposto in questo lavoro fornisce un valido sistema metodologico per affrontare il problema delle frodi, mediante un accurata analisi dei mercati e un'attività di sorveglianza mirata ai prodotti maggiormente soggetti a sostituzione.

7. BIBLIOGRAFIA

1. AA.VV. Future prospects for fish and fishery products. 2007. FAO Fisheries Circular No. 972/4, Part 1 FIEP/C972/4, Part 1 (En)
2. AA.VV. The nine-year period of 1988-1997, routine examinations of seafood products by the National Marine Fisheries Service's National Seafood Inspection Laboratory (NSIL) found that 37% of fish and 13% of other seafood (e.g., shellfish, edible seaweed) from randomly selected vendors were mislabeled. 2010. <http://crs.wikileaks-press.org/RL34124.pdf>
3. AA.VV. Il settore ittico in Italia e nel mondo le tendenze recenti. 2007. Relazione ISMEA
4. Pappalardo A.M, Ferrito V. Fish Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial products in Italy, DNA barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets. 2015. *Fisheries Research*, 164; 153–158
5. KPMG. Gli indicatori generali di frode ed alcuni esempi concreti. (2007) Seminario: Frodi aziendali ed Internal Auditing, Università degli Studi di Verona, Verona.
6. Lenzini C. A., De Rosa V. Frodi nell'esercizio del commercio aspetti giurisprudenziali in tema di condotta tipica del reato. 2008. *Il Pesce*, pp.12.
7. Rehbein H. Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. 1995. *Zeitschrift für Lebensmittel Uterssuehung und Forschxhung* 119: 1
8. Campagna M. C., Marozzi S., Condoleo R., Bottalico N., Nardoni A., Cavallina R. New food frauds in seafood chain: tub gurnard or pangasius? 2011. *Italian Journal of Food Safety*, Vol. 1 N. 1
9. Gallardo M. J., Sotelo C. G., Piñeiro C., Pérez-Martin R. I. Use of capillary zone electrophoresis for fish species identification. Differentiation of flatfish species. 1995. *Journal of Agricultural Chemistry* 43: 1238-1244

10. Armstrong S. G., Leach D. N., Wyllie S. G. The use of HPLC protein profiles in fish species identification. 1992. *Food Chemistry* 44: 147-155
11. Asensio L., González I., Rodríguez M. A., Hernández P. E., García T., and Martín R. PCR-ELISA for the Semiquantitative Detection of Nile Perch (*Lates niloticus*) in Sterilized Fish Muscle Mixtures. 2004. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52 (14), pp 4419–4422
12. Rasmussen R. S, Morrissey M. T. DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species. 2008. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Vol. 7, 2008 TS
13. Dieffenbach C.W., Lowe T.M.J., Dveksler G.S. General Concepts for PCR Primer Design. 1993. *Genome Research* 1993 3: S30-S37
14. Kennedy S. and Oswald N. PCR troubleshooting and optimizations: The essential guide. 2011. MOBIO laboratories, Caister Academic Press, Norfolk UK, pp. 209-213. 25
15. Wilson I. G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. 1997. *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 63, No. 10 p. 3741–3751
16. Guerriero G., Di Finizio A., Trocchia S., Elnwisy N.H., Ciarcia G. juvenile blue fish:species discrimination by PCR-RFLP. 2011. *Biol. Mar. Mediterr.*, 18 (1): 386-387
17. Chena C.H., Hsieh, C.H. Hwang, D.F. Species identification of Cyprinidae fish in Taiwan by FINS and PCR–RFLP analysis. 2012. *Food Control* Volume 28, Issue 2. Pages 240–245
18. Wolf C., Burgener M., Hübner P., Lüthy J. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species. 2000. *Food Science and technology* Volume 33, Issue 2, Pages 144–150

19. Hajibabaei M., Singer G. A. C., Hebert P. D. N., Hickey D. A.. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. 2007. *Trends in Genetics* Vol.23 No.4
20. Cann R. L., Stoneking M., Wilson A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. 1992. *Nature*; 325: 31-36. 32
21. Quinteiro J. Vidal R. Izquierdo M. Sotelo C.G., Chapela M.J., Perez-Martin R.I. Rehbein H., Hold G.L., Russel V.J., Pryde S.E., Rosa C., Santos A.t., Rey-Mendez M. Identification of Hake species (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. 2001. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49: 5108-5114
22. DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets Galal-Khallafa A., Ardura A., Gebaa K.M., Borrella Y.J, Vazqueza E.G. 2014. *Food Control* Volume 46, Pages 441–445
23. Cutarelli A., Maria Grazia Amoroso M.G., Antonella De Roma A., Santa Girardi S., Giorgio Galiero G., Achille Guarino A., Federica Corrado F. Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing 2014. *Food Control* Volume 37, Pages 46–50
24. Filion M. Quantitative Real-time PCR in applied microbiology. 2012. Department of biology universit  de Moncton, Caister Academic Press, Canada, pp.149 26TB
25. Civettini M. Determinazione di virus enterici mediante PR in molluschi bivalvi: messa a punto e validazione. 2010. Tesi di laurea specialistica, Universit  degli Studi di Padova, Facolt  di Scienze MM.FF.NN.
26. Armani A., Lorenzo Castigliero L., Lara Tinacci L., Daniela Gianfaldoni D., Alessandra Guidi A., Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of Bianchetto (juvenile form of *Sardina pilchardus*), Rossetto (*Aphia minuta*), and Icefish in

fresh, marinated and cooked products. 2012. *Food Chemistry*, Volume 133, Issue 1, Pages 184-192

27. AA.VV., A Guide to High Resolution Melting (HRM) Analysis. 2010. www.appliedbiosystems.com/hrm29

28. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. 2004. *Clinical Chemistry*: 10; 1748–1754. 30TB

29. AA.VV., Introduction to High Resolution Melt Analysis. 2012. www.kapabiosystems.com

30. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. 1960. *Educational and Psychological Measurement* 20 (1): 37–46.

31. AA.VV. Manuale metodo FREQ . Anno visualizzazione 2015. www.support.sas.com

32. Landis J.R., Koch G.G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. 1977. *Biometrics* Vol. 33, No. 1, pp. 159-174

33. Roper C. F. E., Sweeney M.J. & Nauen C.E. Species catalogue. Vol. 3. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. 1984. *FAO Fisheries Synopsis* (125) Vol.3:277p

34. Espiñeira M., Vieites J. M., Santaclara F. J. Species authentication of octopus, cuttlefish, bobtail and bottle squids (families Octopodidae, Sepiidae and Sepiolidae) by FINS methodology in seafoods. 2010. *Food Chemistry* 121:527–532

35. Undheim E. A. B., Norman J. A., Thoen H. H., Fry B. G. Genetic identification of Southern Ocean octopod samples using mtCOI. 2010. *Molecular biology and genetics* 333:395–404

36. Parson W., Pegoraro K., Niederstätter H., Föger M., Steinlechner M. Species identification by means of the cytochrome b gene. 2000. *International Journal of Legal Medicine* 114 :23–28
37. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. 1994. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5), 294-299
38. Swets J. A., Measuring the Accuracy of Diagnosis Systems. 1988. *Science* (240):1285-1293.
39. Thrusfield M. *Veterinary epidemiology*, third edition, ©2005-2007 by Blackwell Science Ltd, a Blackwell Publishing company
40. AA.VV. Crosstabulation with Nominal Variables. Anno visualizzazione 2014. www.groups.chass.utoronto.ca
41. Hosmer, D. W., Jr., and S. Lemeshow, 2000. *Applied Logistic Regression*. 2nd ed. New York: Wiley.
42. Pagano M., Gauvreau K. *Principles of Biostatistics*. 2000. 2nd ed. Belmont, CA: Duxbury.
43. Debenedetti F., Dalmaso A., Bottero M.T., Gilli M., Gili S., Tepedino V., Civera T. Application of DNA Barcoding for controlling of the species from Octopus genus. 2014. *Italian Journal of Food Safety*; volume 3:4521
44. Reed G.H., Wittwer C.T. Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. 2004. *Clinical Chemistry* 50:10 1748–1754

45. Radonić A., Thulke S., Mackay I. M., Landt O., Siegert W., Nitschea A. Guideline to reference gene selection for quantitative *real-time* PCR. 2004. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313:856–862
46. Arcangeli G., Corrain C., Boscolo S., Fasolato L., Manfrin A., Monne I., Paparella A., Giorgini S. Prodotti ittici trasformati. Così si identificano le specie. 2007. *Alimenti & bevande*; 11/12: 50-58.
47. Lowenstein J.H., Amato G., Kolokotronis S.O. The Real maccoyii: Identifying Tuna Sushi with DNA Barcodes – Contrasting Characteristic Attributes and Genetic Distances. 2009. *PLoS One*. 4(11): e7866.
48. Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. 2007. *Pharmacogenomics*, pp. 597–608.
49. E.M. Fitzcharlesa, Rapid discrimination between four Antarctic fish species, genus *Macrourus*, using HRM analysis. 2012. *Fisheries Research*. Volumes 127–128, September, Pages 166–170
50. Yancy H.F., Zemplak T.S., Mason J.A., Washington J.D., Tenge B.J., Nguyen N.L.N.T., Barnett J.D., Savary W.E., Hill W.E., Moore M.M., Fry F.S., Randolph S.C., Rogers P.L., Hebert P.D.N., 2008. Potential use of DNA barcodes in regulatory science: applications of the regulatory fish encyclopedia. *J Food Protect* 71:210-7.
51. Filonzi L., Chiesa S., Vaghi M., Nonnis Marzano F. Fish Molecular Barcoding reveals mislabelling of commercial products in Italy. 2010. *Food Research International*. Volume 43, Issue 5, Pages 1383–1388
52. Pappalardo A.M., Ferrito V. DNA Barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets. 2015. *Fisheries Research*, Volume 164, Pages 153–158

53. Armani A. Castigliero L., Tinacci L., Gianfaldoni D., Guidi A. Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of Bianchetto (juvenile form of *Sardina pilchardus*), Rossetto (*Aphia minuta*), and Icefish in fresh, marinated and cooked products Food Chemistry Volume 133, Issue 1, 1 July 2012, Pages 184–192

RIFERIMENTI NORMATIVI:

- D.L. 8 settembre 1999, n.350. Regolamento recante norme per l'individuazione dei prodotti tradizionali di cui all'articolo 8, comma 1, del decreto legislativo 30 aprile 1998, n. 173.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025
- Reg. (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004
- Reg. (CE) n. 104/2000
- Reg. (CE) n. 2065/2001
- Decreto del ministero delle Politiche agricole e forestali del 27 marzo 2002 (integrato più volte nell'elenco delle denominazioni commerciali, da ultimo dal Decreto ministeriale del 23 dicembre 2010
- D.L. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 31 gennaio 2008 e succ. int. fino al decreto 19 novembre 2012 (G.U n 27 1 febbraio 2013)
Denominazione in lingua latina delle specie ittiche di interesse commerciale
- D.L. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 31 gennaio 2008 e succ. int. fino al decreto 19 novembre 2012 (G.U n 27 1 febbraio 2013)
Denominazione in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale
- artt. 439, 440, 442, 444, 515, 516, 517 c.p.

8. ALLEGATI

Appendice A - Riconoscimento morfologico di specie appartenenti al genere *Octopus* e *Amphioctopus*

Octopus vulgaris Cuvier, 1797

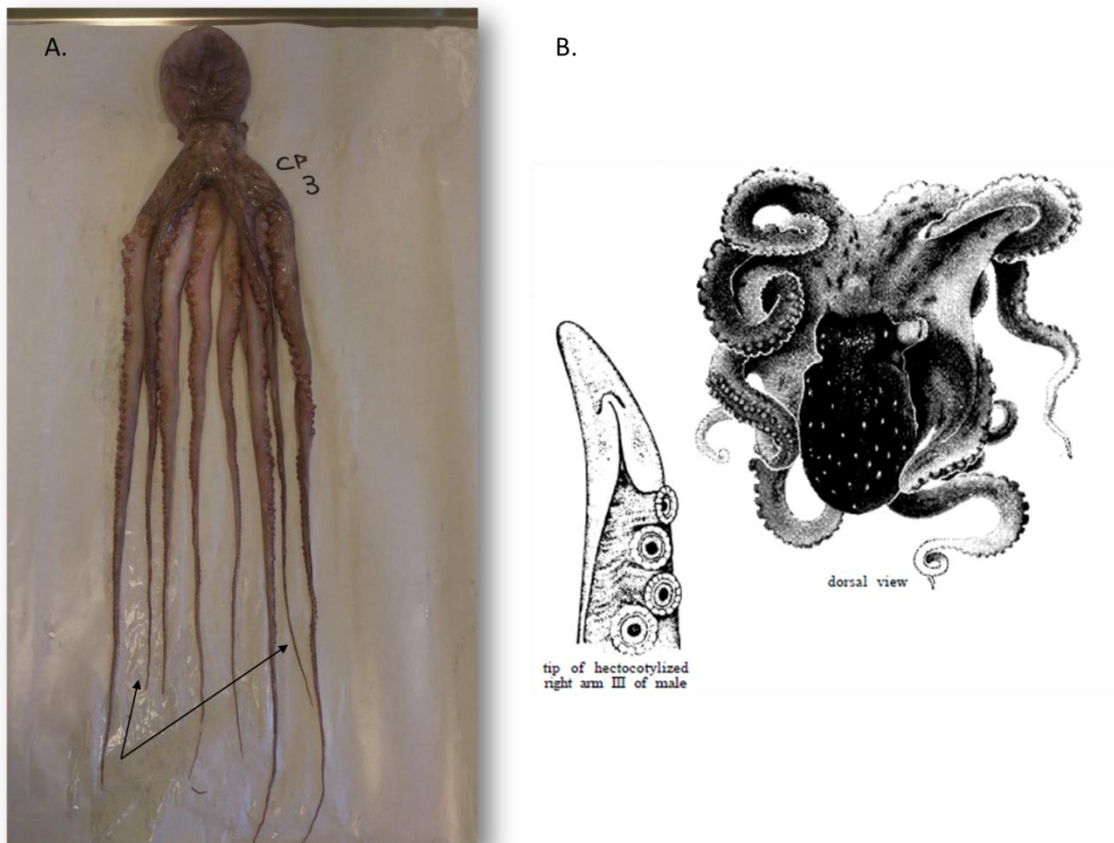


Fig. A1: *Octopus vulgaris*. A. Esemplare intero decongelato*. B. Rappresentazione presente in chiavi di riconoscimento FAO (Roper *et al.*, 1984)

Taglia medio-grande, animale massiccio. Braccia robuste, di uguale lunghezza e diametro tranne il paio 1 che può presentarsi leggermente più corto rispetto agli altri. Nei maschi il tentacolo destro del terzo paio è più corto e presenta una modificazione detta ligula a forma di cucchiaio. La ligula è lunga circa il 2,5% del tentacolo che la porta. Nella parte esterna della branchia vi sono dalle 7 alle 11 lamelle includendo la lamella terminale.

Areale di pesca: 31, 41, 27, 34, 37, 47, 51, 57, 71

Octopus cyanea Gray, 1849

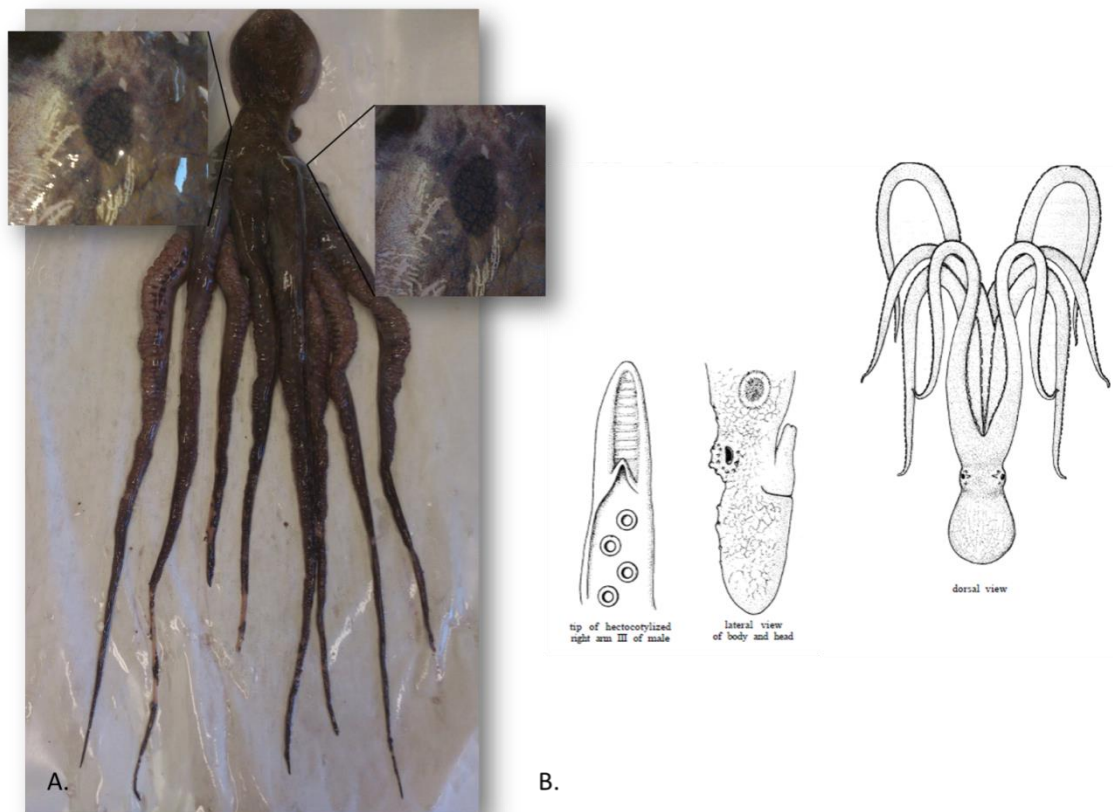


Fig. A2: *Octopus cyanea*. A. Esemplare intero decongelato*. B. Rappresentazione presente in chiavi di riconoscimento FAO (Roper et al., 1984)

Polpo piuttosto robusto. Il mantello può essere rotondo o oblungo, l'epidermide si presenta liscia (senza *papillae*) con alcuni tubercoli; sopra gli occhi si trova un cirro, solitamente accompagnato da due cirri secondari più piccoli; in entrambi i lati del mantello alla base del III e il IV paio di braccia si trova un ocello purpureo-marrone. Le braccia sono tozze e robuste, il quarto paio è leggermente più lungo degli altri. Il tentacolo destro del III paio nei maschi preposto all'accoppiamento porta una ligula molto corta (1,4% della lunghezza del tentacolo); la ligula porta un solco poco profondo con circa 10 creste trasversali più scure; la parte più esterna della branchia porta 10 filamenti. Il mantello ha un colore variegato, reticolato, i tentacoli hanno macchie viola-marroni.

Areale di pesca: 51, 57, 71

Octopus membranaceus Quoy & Gaimard, 1832



Fig. A3: *Octopus membranaceus*. A. Esemplare intero decongelato*. B. Rappresentazione presente in chiavi di riconoscimento FAO (Roper et al., 1984)

Testa oblunga e scolpita con piccoli tubercoli molto vicini che si trovano anche sul mantello e sui tentacoli, due cirri o verruche sopra entrambi gli occhi. Le braccia sono moderatamente lunghe e robuste. Sul mantello alla base del II paio di braccia si trova un ocello cerchiato; il tentacolo destro del III paio porta una ligula sottile e lunga circa il 4-6% della lunghezza del tentacolo che la porta. La parte esterna della branchia porta 7-8 filamenti.

Areale di pesca: 51, 57, 71

Amphioctopus marginatus Kaneko, 2008

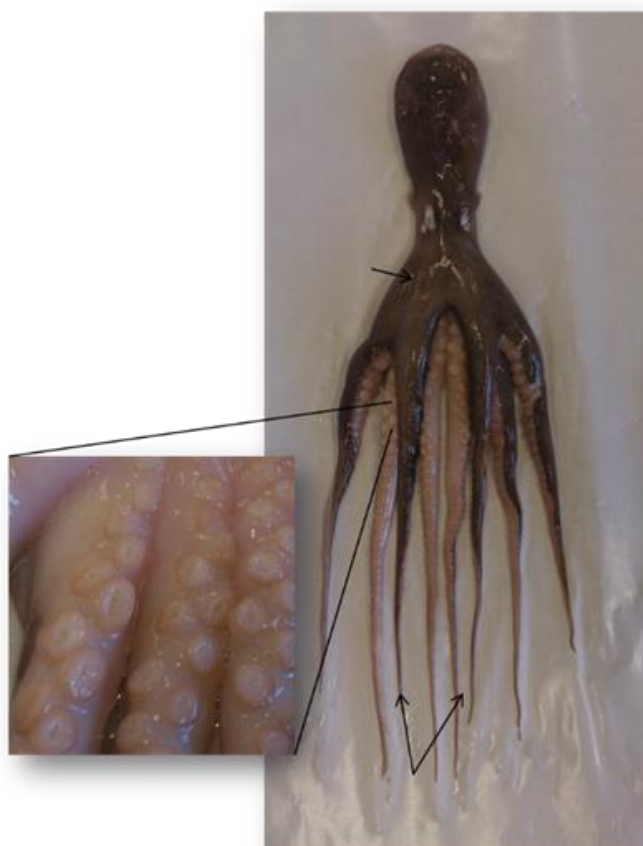


Fig. A4: *Amphioctopus marginatus*. Esemplare intero decongelato*.

Il corpo ha una taglia media (53-83 mm). La testa è circa il 31,7-39% del lunghezza del mantello. Le braccia sono corte (2-3,5 volte la misura del mantello) e circa uguali in lunghezza tranne il I paio che risulta essere più corto. Le ventose nella parte ventrale delle braccia sono disposte in due file e sono circa 121-128 per tentacolo. Il tentacolo destro del III paio porta una ligula sottile e lunga circa 2,1% del tentacolo che la porta e questo normalmente è lungo l'87-90,3% degli altri tentacoli. La parte più esterna della branchia porta circa 9 lamelle. Il colore dell'epidermide è marrone scuro. La parte ventrale dei tentacoli è rosa pallido.

Areale di pesca: 57, 71

Amphioctopus aegina Gray, 1849

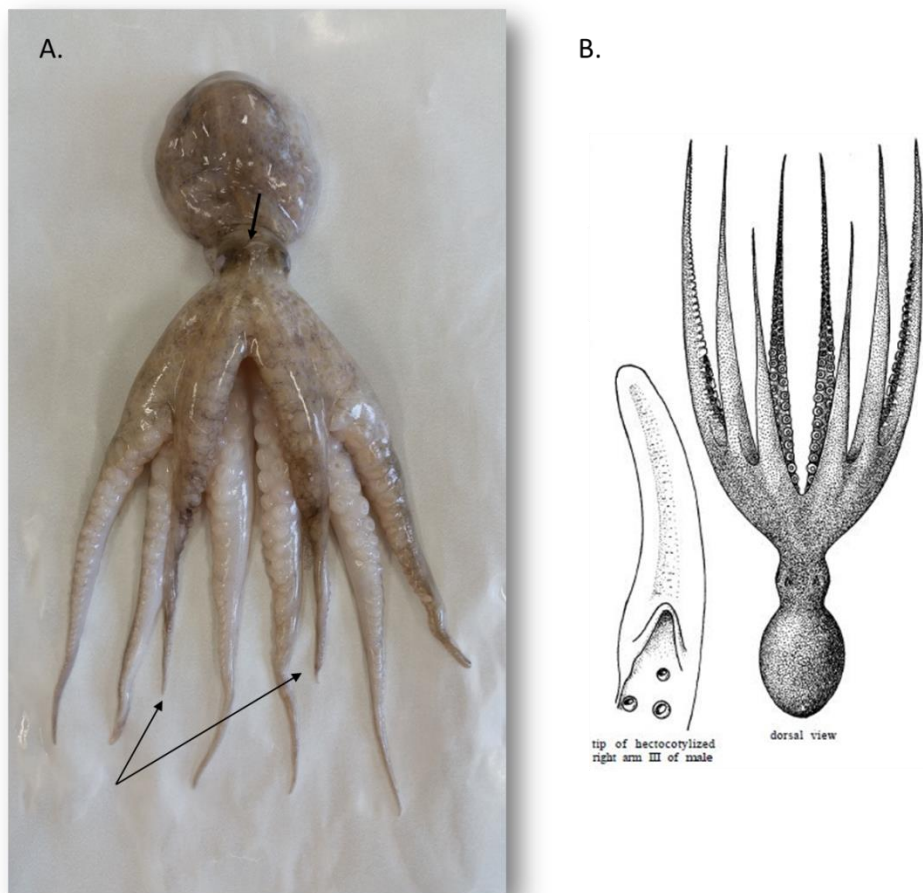


Fig. A5: *Amphioctopus aegina*. A. Esemplare intero decongelato*. B. Rappresentazione presente in chiavi di riconoscimento FAO (Roper et al., 1984)

Il mantello è rotondo o ovale, coperto con piccoli tubercoli o *papillae* fini disposte a reticolo. Gli occhi sono prominenti, presenta un cirro dorsalmente ad ogni occhio; una banda bianca tra gli occhi, non presenta ocelli. Braccia lunghe e robuste, il paio I è leggermente più corto, membrana connettiva tra le braccia del paio I è più rientrante rispetto a quella tra le altre paia. Alla base di ogni ventosa si trovano dei cromatofori più scuri. Il terzo paio nei maschi è usato per l'accoppiamento, la ligula è lunga il 5-8% della lunghezza del braccio. Presenza di 7-10 lamelle nella parte più esterna della branchia; ogni uovo è circa 2 mm.

Areale di pesca: 51, 57, 71

Octopus maya Voss & Solis, 1966

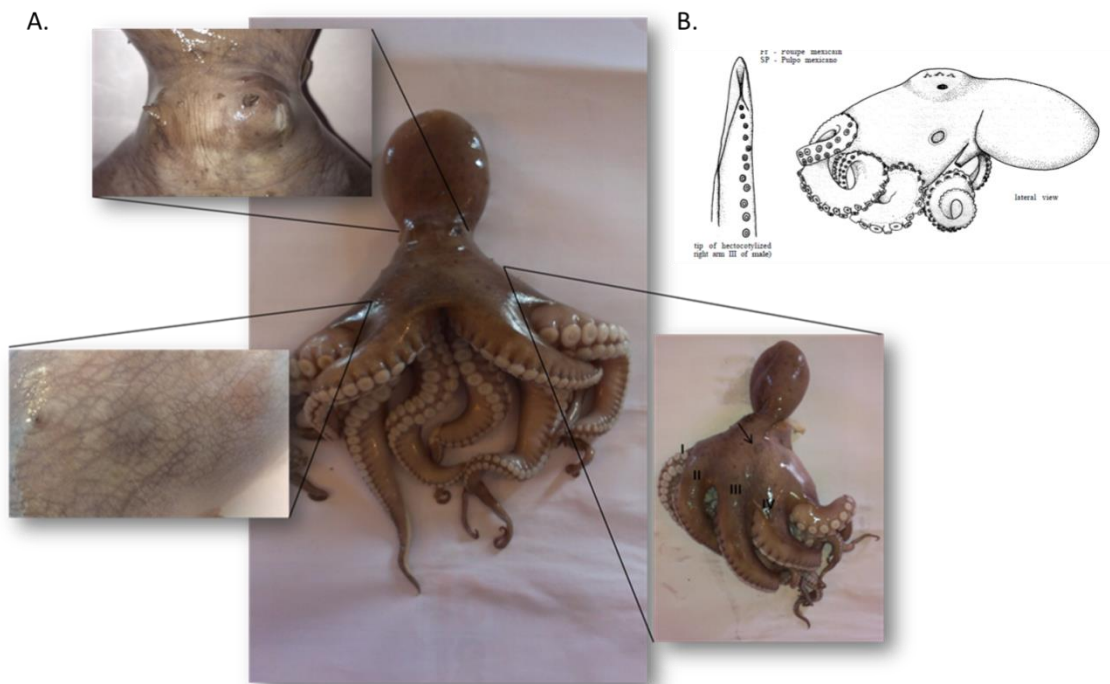
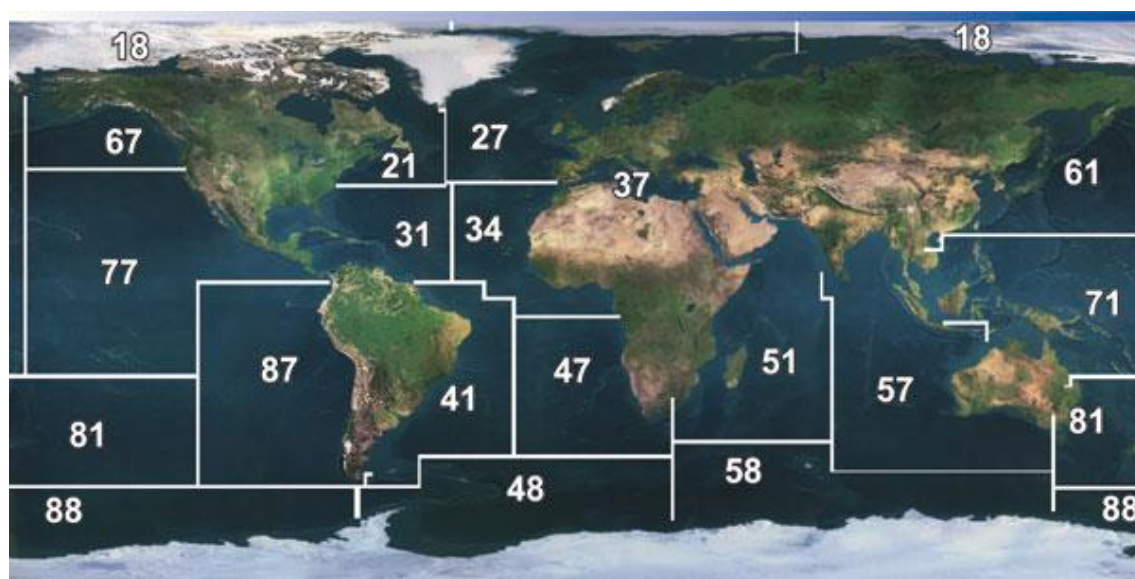


Fig. A6: *Octopus maya*. A. Esemplare intero decongelato*. B. Rappresentazione presente in chiavi di riconoscimento FAO (Roper et al., 1984)

Presenta un grande ocello scuro da entrambi i lati della testa tra il II e il III paio di braccia. Braccia lunghe con parti finali affusolate. Nel maschio il tentacolo atto alla riproduzione è modificato e porta una ligula a forma di cucchiaio (“spoon-shaped”) con i bordi arricciati; il rapporto tra la ligula e il tentacolo è 1.4-1.9. Nella parte esterna della branchia vi sono 9 o 10 lamelle.

Areale di pesca: 31

Aree di pesca



Atlantico nord-occidentale	Zona FAO n. 21
Atlantico nord-orientale	Zona FAO n. 27
Mar Baltico	Zona FAO n. 27 IIIId
Atlantico centro-occidentale	Zona FAO n. 31
Atlantico centro-orientale	Zona FAO n. 34
Atlantico sud-occidentale	Zona FAO n. 41
Atlantico sud-orientale	Zona FAO n. 47
Mar Mediterraneo	Zona FAO n. 37.1, 37.2, 37.3
Mar Nero	Zona FAO n. 37.4
Oceano Indiano Zona	FAO n. 51 e 57
Oceano Pacifico	Zona FAO n. 61, 67, 71, 77, 81 e 87
Antartico	Zona FAO n. 48, 58 e 88

Fig A7: Rappresentazione delle Aree di Pesca del mondo suddivise dalla FAO

*: Fonte immagini Istituto Zooprofilattico delle Venezie sez. Adria (RO)

Appendice B

Thunnus thynnus (Linnaeus, 1758) - Tonno rosso

Morfologia: Il tonno rosso può raggiungere una lunghezza di tre metri e superare i 500 Kg di peso, esso presenta un corpo fusiforme a sezione circolare con altezza massima in corrispondenza della base della metà della prima pinna dorsale. La regione del corsaletto, appena oltre l'apice della pinna pettorale, è coperta da squame più grandi rispetto a quelle delle altre parti del corpo. La testa è grande e gli occhi piuttosto piccoli; il muso è prominente e la bocca, non molto ampia, è munita di un'unica serie di piccoli denti conici presenti anche sul palato. Coda omocerca, molto stretta e munita su ciascun lato di una carena mediana.

Colorazione tipica: Dorsalmente il colore è blu metallico, ventre e fianchi biancastri ma ricchi di iridescenze. La prima pinna dorsale è gialla o bluastra, la seconda pinna dorsale è rosso-bruna (Collette e Nauen, 1983), la pinna anale e le pinnule sono giallo-grigio.

Peculiarità carne: Le sue carni sono molto nutrienti, 100 grammi di parte edibile contengono il 23,3% di proteine e il 4,9% di grassi. In Giappone è consumata fresca soprattutto come sashimi.

Diffusione: Diffuso nell'Atlantico orientale, dalla Penisola Scandinava al Sud Africa e nell'Atlantico occidentale, dal Labrador al Brasile settentrionale. Denominazione obbligatoria: D.M. 25/07/05 MIPAF.^[18, 19]



Figura 1. Immagine di un esemplare di *Thunnus thynnus*.^[19]

Thunnus albacares (Bonnaterra, 1810) - Tonno pinne gialle

Morfologia: Lunghezza massima di 200 cm e peso di 200 kg. La sua caratteristica distintiva risiede nella seconda dorsale e nell'anale molto alte e sviluppate negli esemplari adulti, a forma di falce e lunghe circa 1/5 dell'intero animale. Il peduncolo caudale, molto sottile, porta tre carene: una centrale e due laterali.

Colorazione tipica: Una stria giallo-dorata o blu iridescente corre sui fianchi dall'occhio sino alla coda. Le dorsali e l'anale sono gialle; pinnule gialle con margine nero. Colorazione del dorso blu scura metallica; sul ventre presenza di una ventina di linee più chiare, quasi trasversali e discontinue; margine delle pinnule di colore nerastro.

Peculiarità carne: Gustose e delicate, di colore rosa dopo la cottura. Hanno un basso contenuto in grassi.

Diffusione: Specie cosmopolita presente nelle acque tropicali e subtropicali di tutti gli oceani e dei mari adiacenti, comprese tra 40°N e 40°S (assente nel Mediterraneo, tuttavia permangono alcuni dubbi sulla sua reale presenza nei nostri mari). Forma banchi numerosi che tendono a restare al di sotto del termoclino. Compie migrazioni che tuttavia non sono del tutto conosciute. Si approssima alle coste nei mesi estivi. Denominazione obbligatoria: D.M. 25/07/05 MIPAAF. ^[18, 19]



Figura 2. Immagine di un esemplare di *Thunnus albacares*. ^[19]

Thunnus alalunga (Bonnaterre, 1788) - Tonno bianco

Morfologia: Specie oceanodroma e cosmopolita che può scendere a ben 600 metri di profondità. Dimensioni circa 140 cm massimo, peso 60 Kg circa. Lunghe pinne pettorali, che arrivano sin dietro la seconda pinna dorsale, da cui il nome alalunga; misurano un terzo del corpo del pesce. Ha un occhio piuttosto grande, il cui diametro è contenuto circa 5 volte nella lunghezza della testa. Il corpo è coperto da squame molto piccole che diventano più grandi nella regione del corsaletto.

Colorazione tipica: Colorazione blu scura metallica dorsalmente, biancastra sui fianchi e sul ventre, pinnule ventrali scure e coda con margine bianco.

Peculiarità carne: Rosee chiare (bianche dopo la cottura) e di buona consistenza.

Diffusione: Predilige acque con temperature comprese tra i 10 e i 25°C. Questa specie è diffusa nel mar Mediterraneo (dove è comune anche nelle acque costiere italiane ad eccezione dell'Adriatico) e nell'Oceano Atlantico orientale (dal golfo di Guascogna all'Africa tropicale) e occidentale (dal Maine al Brasile). È una specie pelagica che frequenta acque aperte e costiere. Denominazione obbligatoria: D.M. 25/07/05 MIPAAF. ^[18, 19]



Figura 3. Immagine di un esemplare di *Thunnus alalunga*. ^[19]

Thunnus maccoyii (Castelnau, 1872) - Tonno rosso australe

Morfologia: Simile al tonno rosso dell'Atlantico, ma presenta dimensioni notevolmente inferiori al tonno rosso. La lunghezza è compresa tra 80-120 cm (massimo 245 cm e 260 Kg). Possiede un occhio piuttosto piccolo ed il corpo è ricoperto di squame di piccole dimensioni con corsaletto esteso appena oltre l'apice della pettorale. La seconda pinna dorsale più alta della prima.

Colorazione tipica: Il dorso può essere blu metallico ma anche molto scuro, quasi nero. Nei soggetti adulti carena mediana del peduncolo caudale gialla.

Peculiarità carne: Le sue carni sono ricche di grasso.

Diffusione: I giovani di 1-2 anni si radunano al largo delle coste dell'Australia occidentale, mentre quelli di 3-4 anni si incontrano al largo dell'Australia meridionale in estate e lungo le coste del Nuovo Galles del Sud in inverno. Denominazione obbligatoria: D.M. 25/07/05 MIPAAF. ^[18,19]



Figura 4. Immagine di un esemplare di *Thunnus maccoyii*. ^[19]

Thunnus orientalis (Temminck & Schlegel, 1844) – Tonno pinna blu

Specie oceanodroma quasi identica per caratteristiche morfologiche alla precedente, un tempo ritenuta sottospecie e classificata come *Thunnus thynnus orientalis*.

Diffusione: Diverso l'areale di distribuzione. Vive nel Pacifico orientale, dall'Alaska alla California e nel Pacifico occidentale, dall'Isola di Sakhalin alle Filippine settentrionali. Migrazione tra giugno e settembre in direzione nord, lungo la baia California e le coste del Messico. Specie vulnerabile, a rischio di estinzione. Denominazione obbligatoria: D.M. 25 /07/ 05 MIPAAF. ^[18, 19]



Figura 5. Immagine di un esemplare di *Thunnus orientalis*. ^[19]

Thunnus obesus (Lowe, 1839) - Tonno obeso

Morfologia: Corpo fusiforme, raggiunge una lunghezza di 250 cm con un'altezza massima del corpo in corrispondenza della metà della base della prima vertebra dorsale. Possiede un occhio piuttosto grande il cui diametro è contenuto 6-7 volte nella lunghezza della testa. Peduncolo caudale molto stretto munito di una marcata carena mediana su ciascun lato, compresa fra 2 piccole carene situate alla base di ciascun lobo della pinna caudale.

Colorazione tipica: Dalla colorazione blu scura del dorso e biancastra sui fianchi e sul ventre, si caratterizza per una banda bluastra iridescente che corre lungo i fianchi.

Peculiarità carne: Le sue carni grasse lo rendono ricercato come sostituto del tonno rosso nel mercato giapponese per il sashimi, ma per questo spesso sottoposto a sforzo di pesca eccessivo.

Diffusione: Questo tonno vive nelle acque tropicali e sub-tropicali di tutti gli oceani, raggiungendo grandi profondità. A volte nuotano associati ad oggetti galleggianti. Specie altamente vulnerabile. Denominazione obbligatoria: D.M. 25 /07/ 05 MIPAAF. ^[18, 19]



Figura 6. Immagine di un esemplare di *Thunnus obesus*.^[19]

Thunnus atlanticus – Tonno atlantico

Morfologia: Il tonno atlantico raggiunge i 100 cm alla forca della caudale, l'altezza massima del corpo è raggiunta in corrispondenza della metà della base della prima vertebra dorsale. L'occhio è piuttosto grande il cui diametro è contenuto 6-7 volte nella lunghezza della testa. Il corpo è coperto di squame molto piccole, con corsaletto esteso appena oltre l'apice della pettorale.

Colorazione tipica: Dorsalmente presenta una colorazione blu scura metallica, biancastra sulla parte inferiore dei fianchi e sul ventre; possibile presenza sulla parte ventrale dei fianchi di strisce e macchie pallide. Prima dorsale scura, grigio- brunastra; seconda dorsale ed anale grigio- brunastre chiare con riflessi argentei. Pinnule grigio chiare con una zona colorata di giallo.

Peculiarità carne: Piuttosto apprezzate.

Diffusione: La principale diffusione di questo esemplare la possiamo riscontrare nell'oceano Atlantico Occidentale: specie presente nel Massachusetts fino a Rio de Janeiro, comprese le acque dei Caraibi. Denominazione obbligatoria: D.M. 25 /07/ 05 MIPAAF. ^[18, 19]



Figura 7. Immagine di un esemplare di *Thunnus atlanticus*. ^[19]

Thunnus tonggol – Tonno indopacifico

Morfologia: Questa specie di tonno raggiunge i 130 cm di lunghezza, con altezza massima del corpo in corrispondenza della metà della base della prima vertebra dorsale. L'occhio piuttosto piccolo, mentre il corpo è coperto di squame molto piccole con corsaletto esteso appena oltre l'apice della pettorale.

Colorazione tipica: Ha colorazione blu scura nerastra, sul dorso e bianco argentea sul ventre e sui fianchi, con alcune macchie incolori disposte in file longitudinali.

Peculiarità carne: Le carni sono gustose, compatte e piuttosto scure.

Diffusione: Questo esemplare di tonno è principalmente diffuso nel mar Rosso, nell'oceano Indiano e nel Pacifico. Denominazione obbligatoria: D.M. 25 /07/ 05 MIPAAF. ^[18, 19]



Figura 8. Immagine di un esemplare di *Thunnus tonggol*. ^[19]

