



Università degli studi di Pisa
Dipartimento di Scienze Veterinarie
Corso di Laurea Specialistica in
Medicina Veterinaria

Tesi di laurea
Sviluppo di una metodica PCR Pentaplex per
l'identificazione di specie in prodotti alimentari
a base di medusa

Candidato:
Aurelio Rossi

Relatore:
Prof.ssa Alessandra Guidi

Correlatore:
Dott.: Andrea Armani

ANNO ACCADEMICO 2014-2015

Dedico questa tesi ai miei genitori e a mia sorella

RIASSUNTO

La sostituzione di specie pregiate con altre di minor valore commerciale (*aliud pro alio*) rappresenta una delle frodi più frequenti nel comparto ittico. Le implicazioni connesse con questo tipo di frode possono essere sia di natura commerciale che di natura sanitaria. Pertanto, risulta di fondamentale importanza verificare l'identità dei prodotti ittici per garantirne la rintracciabilità. I prodotti alimentari a base di medusa sono un alimento tradizionale nei Paesi Asiatici; attualmente, però, la loro commercializzazione si sta diffondendo anche verso i mercati occidentali. In particolare, si tratta prodotti di prodotti processati (classici (CP) e *ready to eat* (RE)) nei quali è impossibile riconoscere la specie utilizzata sulla base delle caratteristiche morfologiche. In questo lavoro, è stata sviluppata una metodica PCR Pentaplex per l'identificazione delle 5 specie edibili di medusa (*Nemopilema nomurai*, *Rhopilema esculentum*, *Rhizostoma pulmo*, *Pelagia noctiluca* e *Cotylorhiza tuberculata*), maggiormente utilizzate per la preparazione di tali prodotti. Per l'amplificazione di differenti regioni del gene *COI* per ognuna delle 5 specie target, sono stati realizzati un primer forward degenerato comune e 5 primers reverse specie-specifici. Un'altra coppia di primers, è stata impiegata per l'amplificazione di un frammento del gene *28SrRNA* utilizzato come controllo positivo della reazione. Considerato l'elevato stato di degradazione del DNA estratto dai prodotti commerciali (in particolare nei CP), la lunghezza massima dell'amplicone è stata stabilita a 200 paia di basi. Per lo sviluppo di questa metodica sono stati utilizzati 66 campioni di DNA ottenuto da esemplari di riferimento. Per quanto riguarda i prodotti commerciali, l'amplificazione è stata ottenuta con successo nell'85,4 % dei 48 campioni RE e nel 60 % dei 30 campioni CP esaminati. Tale analisi rappresenta quindi un valido ausilio per l'identificazione molecolare di prodotti della pesca non convenzionali presenti sul mercato comunitario.

Parole chiave: medusa, identificazione di specie, mislabeling, gene *COI* e gene *28SrRNA*, multiplex PCR

ABSTRACT

Seafood species substitution is one of the most common fraud in the fishery sector and could lead to both commercial and sanitary issue for consumers. Therefore, a proper species identification method is required in order to ensure the traceability of marketed products. Jellyfish food products, a traditional food in Asian Countries, is nowadays also spreading on the Western markets. Most of the edible jellyfish are marketed in the form of salted products (CPs), or already desalted ready for consumption (*ready to eat* products- REs). In this work, we developed a Pentaplex PCR for the identification of 5 edible species (*Nemopilema nomurai*, *Rhopilema esculentum*, *Rhizostoma pulmo*, *Pelagia noctiluca*, and *Cotylorhiza tuberculata*), which cannot be identified by a mere visual inspection in jellyfish products sold as food. A common degenerated forward primer and 5 species-specific reverse primers were designed in order to amplify a *COI* gene regions of different lengths. Another primer pair, targeting the *28SrRNA* gene, was intended as common positive reaction control. Considering the high level of degradation in the DNA extracted from acidified and salted products, the maximum length of the amplicons was set at 200 bp. The PCR was developed using 66 DNA samples obtained from reference specimens. It gave successful amplifications in 85.4 % of REs and in 60 % of 30 CPs collected on the market. The multiplex PCR assay developed in this work represents an useful tool for the identification of the most commercialized species of jellyfish and it can be considered a rapid and reliable method in the screening of samples.

Key words: jellyfish, species identification, mislabeling, *COI* gene and *28SrRNA*, multiplex PCR

INDICE

CAPITOLO 1: BIOLOGIA E RIPRODUZIONE DELLE MEDUSE	12
<i>1.1 Classificazione</i>	<i>12</i>
<i>1.2 Classe Scyphozoa</i>	<i>14</i>
<i>1.2.1 Ciclo biologico</i>	<i>15</i>
<i>1.3 Ordine Rhizostomeae</i>	<i>16</i>
<i>1.4 Ordine: Semeaostomeae</i>	<i>24</i>
CAPITOLO 2: DALLA PRODUZIONE ALLA COMMERCIALIZZAZIONE DELLA MEDUSA	27
<i>2.1 Specie di medusa impiegate a scopo alimentare</i>	<i>27</i>
<i>2.2 Produzione e consumo di medusa nel mondo</i>	<i>29</i>
<i>2.2.1 La pesca di meduse a livello mondiale</i>	<i>30</i>
<i>2.2.2 Le nuove tendenze: acquacoltura</i>	<i>31</i>
<i>2.3 Processo di lavorazione e preparazione dei prodotti a base di medusa</i>	<i>32</i>
<i>2.3.1 Preparazione dei prodotti “Ready to eat”</i>	<i>35</i>
CAPITOLO 3: NORMATIVA IGIENICA, TRACCIABILITÀ E ETICHETTATURA DEI PRODOTTI DELLA PESCA	36
<i>3.1 Sicurezza alimentare nell'UE</i>	<i>36</i>
<i>3.2 Normativa comunitaria riguardante i prodotti della pesca</i>	<i>41</i>
<i>3.3 Etichettatura degli alimenti a livello comunitario</i>	<i>45</i>
<i>3.4 Etichettatura dei prodotti ittici</i>	<i>46</i>

CAPITOLO 4: PROBLEMATICHE IGIENICO-SANITARIE E COMMERCIALI DEI PRODOTTI A BASE DI MEDUSA	51
<i>4.1 Conservazione dei prodotti della pesca</i>	<i>51</i>
<i>4.2 Idoneità al consumo umano dei prodotti della pesca</i>	<i>51</i>
<i>4.2.1 Contaminazione chimica e residui farmacologici dei prodotti della pesca</i>	<i>52</i>
<i>4.2.2 Contaminazione biologica dei prodotti della pesca</i>	<i>54</i>
<i>4.3 Contaminazione ed idoneità al consumo dei prodotti a base di medusa</i>	<i>56</i>
<i>4.3.1. Contaminazione chimica nei prodotti a base di medusa: presenza di residui di allume</i>	<i>56</i>
<i>4.3.2 Rischi microbiologici nei prodotti a base di medusa</i>	<i>58</i>
<i>4.4 Il problema della tracciabilità dei prodotti alimentari a base di medusa</i>	<i>59</i>
CAPITOLO 5: LE FRODI NEL SETTORE ITTICO	61
<i>5.1. Le Frodi alimentari: origini ed evoluzione</i>	<i>61</i>
<i>5.1.1 Classificazione delle frodi alimentari</i>	<i>63</i>
<i>5.2 Le frodi nel comparto ittico</i>	<i>65</i>
CAPITOLO 6: APPROCCIO ANALITICO PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE NEI PRODOTTI ITTICI	68
<i>6.1 Cenni sulle metodiche analitiche per l'identificazione di specie ittiche</i>	<i>69</i>
<i>6.1.1 Analisi degli acidi grassi</i>	<i>69</i>
<i>6.1.2 Analisi delle proteine</i>	<i>69</i>
<i>6.1.3 Tecniche basate sull'analisi del DNA</i>	<i>72</i>
<i>6.1.3.1 Il DNA mitocondriale</i>	<i>73</i>
<i>6.2 Metodiche di estrazione degli acidi nucleici</i>	<i>75</i>
<i>6.3 La reazione a catena della polimerasi (PCR)</i>	<i>77</i>
<i>6.3.1 Modificazioni chimiche del DNA negli alimenti</i>	<i>82</i>
<i>6.3.2 Contaminanti e inibizione della PCR</i>	<i>82</i>
<i>6.4 Elettroforesi</i>	<i>83</i>
<i>6.5 Applicazioni della tecnica PCR</i>	<i>84</i>
<i>6.5.1 PCR multiplex</i>	<i>84</i>
<i>6.5.2 Tecniche che prevedono il sequenziamento: FINS e DNA Barcoding</i>	<i>85</i>

CAPITOLO 7: SCOPO DELLA TESI	87
CAPITOLO 8: MATERIALI E METODI	88
<i>8.1 Campioni di riferimento</i>	<i>88</i>
<i>8.2 Estrazione del DNA totale con il protocollo standard</i>	<i>88</i>
<i>8.2.1 Estrazione del DNA</i>	<i>88</i>
<i>8.3 Quantificazione spettrofotometrica del DNA totale</i>	<i>89</i>
<i>8.4 Amplificazione del gene COI e del gene 28SrRNA</i>	<i>89</i>
<i>8.4.1 COI</i>	<i>89</i>
<i>8.4.2 28SrRNA</i>	<i>90</i>
<i>8.5 Disegno dei primers per la PCR Multiplex</i>	<i>91</i>
<i>8.5.1 Primers specie-specifici aventi come target il gene COI</i>	<i>91</i>
<i>8.5.2 Primers di controllo della PCR aventi come target il gene 28SrRNA</i>	<i>91</i>
<i>8.6 Ottimizzazione della reazione di PCR</i>	<i>91</i>
<i>8.7 Protocollo di Pentaplex PCR finale e analisi dei campioni commerciali</i>	<i>92</i>
CAPITOLO 9: RISULTATI E DISCUSSIONE	93
<i>9.1 Scelta delle specie e del DNA target</i>	<i>93</i>
<i>9.1.1 Scelta delle specie</i>	<i>93</i>
<i>9.1.2 Scelta del DNA target</i>	<i>93</i>
<i>9.2 Disegno dei primer</i>	<i>94</i>
<i>9.2.1 Primers specie-specifici aventi come bersaglio il gene COI</i>	<i>94</i>
<i>9.2.2 Primer di controllo della PCR aventi come bersaglio il gene 28SrRNA</i>	<i>95</i>
<i>9.3 PCR Pentaplex: sviluppo e protocollo finale</i>	<i>95</i>
<i>9.3.1 Concentrazione di primers e di DNA template</i>	<i>96</i>
<i>9.3.2 MgCl₂, nucleotidi e Taq polimerasi</i>	<i>96</i>
<i>9.3.3 Condizioni di ciclaggio</i>	<i>96</i>
<i>9.4 Validazione della Pentaplex PCR utilizzando campioni di DNA di prodotti commerciali a base di medusa</i>	<i>97</i>
<i>9.5 Etichettatura dei prodotti a base di medusa: problematiche e prospettive</i>	<i>97</i>
CAPITOLO 10: CONCLUSIONI	99
APPENDICE	100

<i>BIBLIOGRAFIA</i>	<i>114</i>
<i>RIFERIMENTI NORMATIVI</i>	<i>128</i>
<i>RINGRAZIAMENTI</i>	<i>134</i>

CAPITOLO 1: BIOLOGIA E RIPRODUZIONE DELLE MEDUSE

All'interno del Phylum Cnidaria (o Coelenterata), oltre ad anemoni di mare e coralli, vi troviamo anche le diverse specie di meduse, la gran parte delle quali sono inserite nella Classe Scyphozoa.

Le meduse sono organismi acquatici che vivono in tutti i mari e oceani del mondo; finora si pensava che la distribuzione di tali organismi fosse dovuta al semplice trasporto passivo tramite le correnti marine, ma un recente studio (Hays *et al*, 2015) ha dimostrato come le meduse siano in grado di rilevare la direzione delle correnti e se necessario di poter nuotare attivamente. Secondo i ricercatori è possibile che le meduse percepiscano il flusso dell'acqua sulla superficie del loro corpo, oppure che valutino indirettamente la direzione di deriva utilizzando il campo magnetico della Terra, o gli infrasuoni, che si possono originare dai fenomeni naturali. Comprendere la distribuzione delle meduse consente di ampliare le conoscenze sul comportamento di questi animali, che rappresentano un'importante fonte di cibo per le tartarughe marine e per altre specie e sono quindi importanti per l'ecosistema marino.

1.1 Classificazione

Il Phylum Cnidaria è suddiviso in 4 Classi: Anthozoa, Scyphozoa, Hydrozoa e Cubozoa.

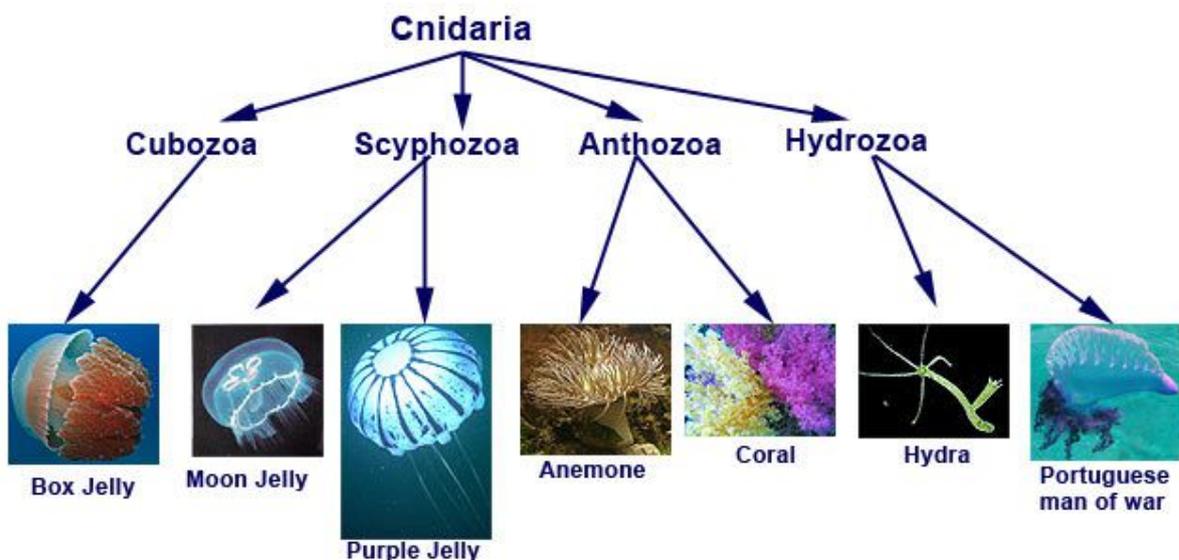


Fig. 1.1: suddivisione delle diverse classi di Cnidari (Fonte: www.mesa.edu.au)

Si tratta in generale di organismi diploblastici, costituiti cioè da solo due foglietti embrionali primari: endoderma, dal quale originano epidermide e derivati, tessuti nervosi e

recettori sensoriali ed ectoderma, che darà origine all'epitelio del canale alimentare. Tra l'epidermide e il canale alimentare è presente la mesoglea, costituita da una matrice gelatinosa e amorfa, che ha la funzione di facilitare il galleggiamento. Il corpo presenta un'unica cavità, il *coelenteron* (da cui il termine “celenterati”), anche detta cavità gastrovascolare, che è in contatto con l'acqua circostante attraverso la bocca e nel quale avvengono gli scambi gassosi con l'esterno, la digestione e la liberazione dei gameti. Inoltre all'interno di tale cavità è presente uno “scheletro idrostatico”, ovvero una colonna liquida mantenuta in sede dai muscoli della regione orale la cui pressione è regolata dai muscoli di ectoderma e endoderma (Hale, 1999; Hickman *et al*, 2001).

Gli Cnidari sono tutti carnivori muniti, in particolare a livello dei tentacoli, di cellule urticanti, dette cnidociti, aventi funzione di difesa e predazione. Ogni cnidocita presenta una capsula contenente un liquido tossico (ipnotossina) e un filamento urticante, detto nematocita, avvolto a spirale. All'esterno del cnidocita vi è una piccola terminazione sensoria, lo cnidociglio, che a seguito di stimolazione determina l'estroffessione del nematocita consentendo l'azione di difesa o di predazione. L'alimento predato, viene così introdotto attraverso la bocca nella cavità gastrovascolare e digerito. La digestione è in parte extracellulare e in parte intracellulare; non essendovi organi preposti alla escrezione, i cataboliti e i prodotti di rifiuto vengono eliminati attraverso l'apertura buccale.

Gli Cnidari si possono riprodurre sia per via agamica (scissione o gemmazione) che per via gamica (tramite gameti) e le due forme adulte sotto cui si presentano sono quella di polipo (forma fissa) e quella di medusa (forma libera e natante); nel caso in cui il ciclo biologico dello cnidario comprenda sia lo stadio di polipo che quello di medusa, si parla di “alternanza di generazioni o metagenesi” (Hale, 1999; Hickman *et al*, 2001).

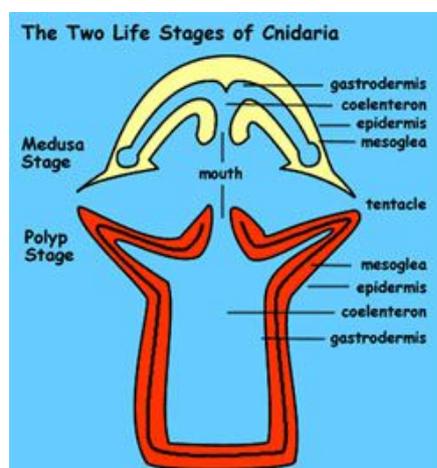


Fig. 1.2: struttura di Cnidari in sezione (Fonte: www.mesa.edu.au)

Gli Cnidari possono presentare 3 tipi di ciclo biologico (Hale, 1999; Hickman *et al*, 2001):

- 1) solo stadio di medusa (raro)
- 2) sia polipo sia medusa (più frequente), con alternanza di una generazione agamica, rappresentata dal polipo, ed una gamica rappresentata dalla medusa
- 3) solo polipo (Anthozoa e Hydrozoa), come ad es. anemoni di mare, coralli, etc...

1.2 Classe Scyphozoa

Le “vere meduse” (Hale, 1999) fanno parte della Classe Scyphozoa e sono dotate di un corpo a forma di campana od ombrello; presentano una enorme variabilità interspecifica per quanto riguarda dimensioni, forma e colore. Le dimensioni variano generalmente tra 2 e 40 cm (alcune come *Cyanea capillata*, possono raggiungere i 2 metri di diametro con tentacoli lunghi fino a 40 metri, che le fanno guadagnare l'appellativo di medusa “criniera di leone”).

Sulla base di caratteristiche morfologiche e di distribuzione la Classe Scyphozoa si suddivide in 4 Ordini: *Rhizostomae*, *Semaeostomae*, *Coronatae* e *Stauromedusae* (Hale, 1999).

Strutturalmente gli Cnidari presentano una mesoglea piuttosto spessa e pertanto l'animale si presenta di aspetto gelatinoso ed è proprio per tale motivo che, a livello internazionale, la medusa viene definita “*jellyfish*”, cioè pesce gelatina (Hale, 1999).

Il margine della campana è tipicamente ondulato e forma dagli 8 ai 16 lobi (o lembi), talvolta può possedere degli cnidociti, i quali tuttavia sono localizzati prevalentemente a livello dei tentacoli.

La bocca, situata al termine di una protuberanza tubulare a forma di imbuto, è detta *manubrium*. Occupa una posizione centrale sul lato concavo del corpo ed è circondata da 4-8 braccia orali (tentacoli); queste ultime hanno funzione di convogliare il cibo verso la bocca e, attraverso questa, alla cavità gastrovascolare. Tale cavità appare ripartita in 4 tasche gastrali, divise tra loro da altrettanti setti (a livello dei quali si trovano anche le gonadi).

Le braccia orali sono dotate di cnidociti con funzionalità di difesa e predazione.

Il sistema nervoso ha una struttura piuttosto elementare ed è costituito fondamentalmente da una serie di recettori fotosensibili e organi di equilibrio (statocisti), distribuiti intorno a delle strutture sensoriali, dette ropali, disposte ai margini della campana. Ogni cambiamento di direzione nello spazio determina una compressione della statocisti contro il ciglio tributario e la generazione di potenziali d'azione, innescando un meccanismo che consente all'animale di orientarsi (Arai, 1997).

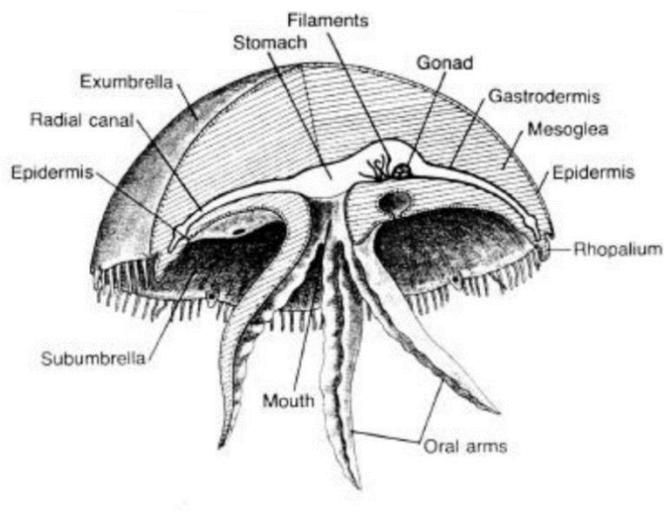


Fig. 1.3: *medusa adulta* (Hale, 1999)

1.2.1: *Ciclo biologico* (Hale, 1999)

Il ciclo biologico della Classe Scyphozoa alterna una fase polipoide (o bentonica) asessuata e una medusoide (o planctonica) sessuata; quest'ultima rappresenta la fase preminente.

Il *polipo* (o *schipistoma*) si presenta a forma di calice o coppa avente un corto peduncolo provvisto, generalmente, di 4 tentacoli; da esso generano, tramite gemmazione altri polipi e, in particolari periodi dell'anno, sotto l'influenza di fattori esogeni (es. ambientali, etc...) e endogeni (ormonali, etc...) attraverso un fenomeno definito strobilazione (consistente in una serie di scissioni trasversali del corpo) produce numerosi stadi giovanili di meduse, dette *efire*, aventi dimensioni molto ridotte (1-3 mm). Tali efire nell'arco di alcune settimane svilupperanno in *meduse adulte*. Queste ultime hanno solitamente sessi separati con gonadi poste sui due lati di ciascun setto gastrale. La fase riproduttiva prevede l'espulsione, attraverso l'apertura orale, delle uova da parte della femmina e degli spermatozoi da parte del maschio con la successiva fecondazione esterna, nell'ambiente acquatico. In seguito alla fecondazione si sviluppa la *planula* (forma larvale liberamente natante) che successivamente si fissa sul fondale dando origine a nuovi polipi.

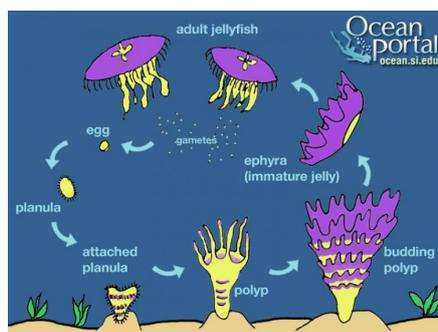


Fig. 1.4: *rappresentazione grafica del ciclo biologico* (Fonte: www.ocean.si.edu)

1.3 Ordine Rhizostomeae

All'Ordine delle Rhizostomeae appartengono 10 distinte famiglie: *Cassiopeidae* (Agassiz, 1862), *Catostylidae* (Gegenbaur, 1857), *Cepheidae* (Agassiz, 1862), *Lobonematidae* (Stiasny, 1931), *Lychnorhizidae* (Haeckel, 1880), *Mastigiidae* (Stiasny, 1931), *Rhizostomatidae* (Cuvier, 1799), *Stomolophidae* (Haeckel, 1880), *Thysanostomatidae* (Haeckel, 1880), *Versurigidae* (Maas, 1903) le quali si differenziano sia dal punto di vista morfologico che per la distribuzione geografica.

Caratteristiche morfologiche comuni sono le seguenti: campana priva di tentacoli, con quattro paia di braccia orali fuse tra loro in un manubrio suddiviso in numerosi canali intercomunicanti ed aperti esternamente, sono inoltre sprovvisti di una vera cavità buccale per cui l'alimento viene convogliato direttamente nello stomaco dell'animale attraverso queste molteplici incanalature. I margini della campana sono suddivisi in otto o più lobi, sui quali sono disposti gli organi sensoriali (ropali).

Alla famiglia delle *Cassiopeidae* appartiene il solo genere *Cassiopea*, le cui specie principali sono rappresentate da *C. andromeda* (Forskaal, 1775), *C. frondosa* (Pallas, 1774), *C. ornata* (Haeckel, 1880) e *C. xamachana* (Bigelow, 1892). Tali specie presentano una campana tendenzialmente appiattita di colore variabile dal marrone al grigio-blu fino al verdognolo (Sterrer, 1986). Le *Cassiopeidae* hanno la caratteristica di essere provviste, in particolare a livello delle braccia orali, di alghe simbiotiche (zooanthella); tali alghe per mezzo della fotosintesi trasformano l'energia solare in composti organici che sono direttamente utilizzabili da tali meduse. Inoltre, diversamente dalle altre meduse, le *Cassiopeidae* vivono sul fondale marino con la campana rivolta verso il basso (a contatto con il fondale) e le braccia orali verso l'alto, in tal modo espongono alla luce solare le alghe simbiotiche favorendone lo sviluppo (Hale, 1999).

Le aree geografiche di maggior distribuzione sono le acque atlantiche occidentali e quelle indo-pacifiche, ma si ritrovano anche nel Mar Rosso e nel Mar Mediterraneo (Schembri *et al*, 2010).



Fig. 1.5: *Cassiopea andromeda* (Fonte: WoRMS www.marinespecies.org)

Alla famiglia *Catostylidae* appartengono diversi generi, i più importanti sono *Catostylus spp.*, *Crambione spp.* e *Crambionella spp.* Hanno una campana di dimensioni variabili dal colore solitamente giallo-marrone (poiché la superficie della campana spesso è colonizzata da alghe unicellulari), in assenza di tali microrganismi assume una colorazione bluastra (Hale, 1999). Le braccia orali sono a forma di foglia.

La specie *Catostylus mosaicus* (Quoy & Gaimard, 1827) è quella più diffusa nelle acque australiane settentrionali e orientali, dove generalmente si concentra a livello delle foci dei fiumi (Dawson, 2005). Presenta una campana di forma emisferica finemente granulata, ed ha un diametro di circa 35 cm; il colore varia a seconda della presenza o meno di microrganismi commensali sulla sua superficie.



Fig. 1.6: *Catostylus mosaicus* (Fonte: www.aquaportail.com)

Nel genere *Crambionella*, la specie più rappresentativa è *Crambionella orsini* (Vanhoffen, 1888), la quale vive soprattutto nelle acque dell'Oceano Indiano, ma è presente anche nel Golfo Arabico, lungo le coste del Kenya e nel Mar Rosso; ha una campana liscia del diametro di circa 15-16 cm e otto braccia orali. Il colore di queste meduse varia dal bianco al giallognolo (Kitamura & Omori, 2010). Tale specie viene pescata e regolarmente consumata nei Paesi asiatici (Kitamura & Omori, 2010). La specie più rappresentativa del genere *Crambione* è *Crambione mastigophora* (Maas, 1903). Presente soprattutto nelle acque dell'Oceano Indiano e del Pacifico occidentale; ha una campana liscia relativamente piatta, del diametro di circa 25 cm e di colore giallognolo. Anche questa specie viene pescata e consumata come alimento.

Nella famiglia *Cepheidae* vi sono principalmente due generi *Cephea* e *Cotylorhiza*.

Cephea cephea è distribuita soprattutto nelle zone tropicali dell'Oceano Atlantico centro-orientale, nelle acque indo-pacifiche e nel Mar Rosso (WoRMS www.marinespecies.org); presenta una campana che può raggiungere i 40 cm di diametro, di colore rosa-lilla sulla

faccia superiore e marrone su quella inferiore. Le braccia orali sono ripiegate su se stesse e nella loro parte terminale presentano delle appendici filamentose.

Cotylorhiza tuberculata (Macri, 1778) vive nelle acque mediterranee in maniera ubiquitaria, con una concentrazione maggiore a livello del Mar Adriatico; originaria del Mar Rosso, ha raggiunto nuovi habitat a seguito dell'apertura del Canale di Suez (Galil *et al.*, 1990). La campana è tendenzialmente piatta, lievemente rialzata al centro, del diametro di circa 30 cm con margini tipicamente frastagliati. Di colore giallo, talvolta verdastro per la presenza di zooxantelle; possiede otto braccia orali terminanti con un bottone apicale di colore blu/viola (AIAM www.aiamitalia.it).



Fig. 1.7: *Cotylorhiza tuberculata* (Fonte: WoRMS www.marinespecies.org)

La famiglia *Lobonematidae* comprende due generi *Lobonemoides* e *Lobonema*. Tali meduse sono tipiche delle acque indo-pacifiche occidentali (Hale, 1999), vengono comunemente pescate e consumate dalle popolazioni asiatiche (Kitamura & Omori, 2010). Il genere *Lobonemoides*, presenta due specie *Lobonemoides robustus* e *Lobonemoides gracilis*; la prima ha una campana più grande (circa 38-46 cm di diametro). Nel genere *Lobonema*, la specie commestibile è *Lobonema smithii*.

Le *Lobonematidae* sono commercialmente conosciute come “Tipo Bianco”; frequentemente pescate nelle Filippine, nel Vietnam, in Thailandia e in Birmania (Omori & Nakano, 2001).



Fig. 1.8: *Lobonema smiithi* (Fonte: www.gettyimages.com)

Alla famiglia *Lychnorhizidae* appartengono due generi principali *Lychnorhiza* e *Pseudorhiza*. *Lychnorhiza lucerna* (Haeckel, 1880) è la specie più numerosa dell'Oceano Atlantico sud-occidentale (Mianzan, 1986). Morfologicamente *L. lucerna* varia a seconda dello stadio vitale in cui si trova (le meduse più giovani hanno una campana emisferica di circa 7 cm di diametro, successivamente la campana tende ad appiattirsi, fino a raggiungere la forma discoidale di circa 45 cm di diametro, tipica della medusa adulta). Possiede otto braccia orali di forma appiattita, provviste nella parte terminale di appendici filamentose. Il colore della campana è variabile dal bianco fino al marrone scuro (*Marine Species Identification Portal* www.species-identification.org).



Fig. 1.9: *Lychnorhiza lucerna* (Fonte: www.projectnoah.org)

Pseudorhiza haeckeli (Haacke, 1884) vive nelle acque dell'Australia meridionale; ha una campana del diametro di circa 30-40 cm con aspetto rugoso (*WoRMS* www.marinespecies.org).

Alla famiglia *Mastigiidae* appartengono due generi principali *Mastigias* e *Phyllorhiza*. Entrambi originari delle acque asiatiche, sono state introdotte in habitat diversi, per via

naturale o accidentale (trasportate dai mezzi marittimi). In particolare la specie *Phyllorhiza punctata* è dotata di una elevata capacità di adattamento, perciò nel corso degli anni ha invaso gran parte delle acque del globo (eccezion fatta per quelle artiche e antartiche) (Botton & Graham, 2004). Secondo Graham *et al*, (2003), la causa principale del passaggio dalle acque del Pacifico a quelle dell'Atlantico potrebbe essere dovuto all'apertura del Canale di Panama; allo stesso modo, ha raggiunto le acque del Mediterraneo (in particolare il Mar Ionio) a seguito dell'apertura del Canale di Suez (Abed-Navandi & Kikinger, 2007). Morfologicamente *P. punctata* ha una campana piuttosto grande (circa 60 cm di diametro) e appiattita di colore marrone chiaro con numerose macchie bianche luminose sulla superficie (Graham *et al*, 2003; Perry & Larsen, 2004). Vive in simbiosi con zooxantelle che le conferiscono la caratteristica colorazione marrone della campana.

Alla famiglia *Rhizostomatidae* appartengono tre generi *Rhopilema* (Haeckel, 1880), *Nemopilema* (Kishinuoye, 1992) e *Rhizostoma* (Cuvier, 1799) comprendenti la maggior parte delle specie di medusa considerate commestibili e comunemente commercializzate nei Paesi del Sud-Est Asiatico, in Giappone e in Cina. Gli appartenenti alla famiglia *Rhizostomatidae* sono particolarmente diffusi nelle acque indo-pacifiche, ma sono stati osservati esemplari anche nel Mar Mediterraneo e nell'Oceano Atlantico.

La specie *Rhopilema esculentum* (Kishinuoye, 1891), anche detta *Rhopilema asamushi* (Uchida, 1927) si trova soprattutto nelle acque giapponesi e cinesi, in particolare nelle zone costiere e nelle baie. Gran parte degli individui di tale specie risulta distribuita nel Mare Interno del Giappone, nella Baia di Suruga, nel Mare Cinese Orientale (Omori & Kitamura, 2004) e nel Mar Giallo, soprattutto lungo la costa della penisola di Liaotung e della Corea (Gao *et al*, 2002). Rappresenta la maggiore risorsa di medusa commestibile in Cina.

Rhopilema esculentum ha una campana liscia di circa 70 cm di diametro avente ai margini delle lobature rotondeggianti (Omori & Kitamura, 2004); le otto braccia orali sono fuse prossimalmente mentre sono separate distalmente, ognuna termina con tre alette dalle quali si dipartono delle proiezioni filamentose.

Vi sono due varietà di *R. esculentum*, quella bianca e quella rossa (rosso-marrone); alcuni riportano l'esistenza di esemplari blu (Omori & Kitamura, 2004). Secondo le testimonianze dei pescatori locali, la maggior parte delle meduse catturate durante l'anno e soprattutto a inizio estate si presentano nei classici colori bianco e rosso, ma nei soli due mesi di Agosto e Settembre vi è una massiccia presenza di individui blu (Omori & Kitamura, 2004).



Fig. 1.10: *Rhopilema esculentum* (Fonte: www.thescyphozoan.ucmerced.edu)

La specie *Rhopilema hispidum* (Vanhoffen, 1888) è distribuita soprattutto nel Mar Cinese Meridionale, nella zona di Hong Kong, nel Mare di Ariake (Omori & Kitamura, 2004), lungo le coste giapponesi meridionali (Uchida, 1954) e nelle acque del Sud-Est Asiatico.

R. hispidum ha una campana di circa 70 cm di diametro avente numerose macchie che protrudono dalla superficie; con l'avanzare dell'età tali formazioni tendono ad aumentare in dimensioni, inoltre inizialmente sono incolori e rotondeggianti mentre successivamente assumono una colorazione giallastra e una forma appuntita. I margini sono suddivisi in lobi con aspetto triangolare. Le otto braccia orali, prossimalmente risultano fuse tra loro mentre distalmente sono libere ed ognuna termina con tre alette dalle quali dipartono delle proiezioni filamentose (Omori & Kitamura, 2004).

La specie *Rhopilema verrilli* (Fewkes, 1887) vive nell'Oceano Atlantico occidentale, tipica in particolare del Golfo del Messico, dove è distribuita soprattutto lungo le coste della Florida nei mesi estivi (WoRMS www.marinespecies.org). *R. verrilli* ha una campana liscia di colore bianco crema con screziature marroni ai margini; presenta una caratteristica forma a fungo (per questo viene denominata anche come “*mushroom jellyfish*”) delle dimensioni di circa 20 cm di diametro.

La specie *Rhopilema nomadica* (Galil, 1990) è originaria delle acque tropicali indo-pacifiche, tuttavia a seguito dell'apertura del Canale di Suez ha raggiunto il Mar Mediterraneo, colonizzando massivamente soprattutto l'area sud-orientale (Galil *et al*, 1990); attualmente è considerata nell'elenco delle 100 specie più invasive delle acque europee, redatto dal “DAISIE *Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe*”.

Dal punto di vista morfologico *R. nomadica* presenta una campana con tubercoli tondeggianti sulla superficie e dimensioni di circa 30-60 cm di diametro (Galil *et al*, 1990).

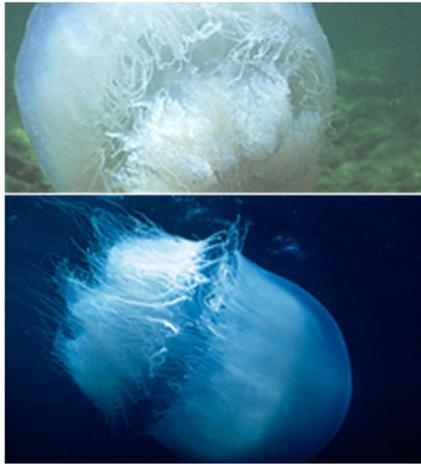


Fig. 1.11: *Rhopilema nomadica* (Fonte: www.meteomeduse.focus.it)

La specie *Nemopilema nomurai* (Kishinouye, 1922) è una medusa di notevoli dimensioni (circa 2 m di diametro e 200 kg di peso); rappresenta la più grande medusa asiatica (Omori & Kitamura, 2004). Vive nell'Oceano Pacifico nord-occidentale, in particolare nel Mar Giallo (Hong *et al*, 1978), nella parte settentrionale del Mar Cinese orientale (Gao *et al*, 2002) e nel Mar del Giappone (Omori & Kitamura, 2004).

Nel 2005, durante la stagione estiva, vi è stato una massiccio fenomeno di “fioritura” di *N. nomurai* intorno all'isola di Tsushima, nel Mare del Giappone (Uye, 2008). Da un punto di vista morfologico *N. nomurai* presenta una campana ricoperta da numerose formazioni verrucose, incolori, di dimensioni maggiori nella porzione centrale. I margini sono suddivisi in otto grandi lembi, a loro volta divisi in molteplici lembi più piccoli. Le otto braccia orali, a forma di J, sono fuse prossimalmente tra loro, mentre risultano essere libere distalmente; terminano con tre alette dalle quali dipartono le proiezioni filamentose (Omori & Kitamura, 2004).



Fig. 1.12: *Nemopilema nomurai* (Fonte: www.thescyphozoan.ucmerced.edu)

La specie *Rhizostoma pulmo* (Macri, 1778) è la medusa più comune delle acque mediterranee (Fuentes *et al*, 2011); difatti, il suo riscontro è frequente nel Mar Adriatico, nel Mar Ionio, nel Mar Tirreno, nel Mar Ligure, nelle acque della Tunisia, nel Mar Nero (Mariottini & Pane, 2010). Inoltre è presente anche nell'Oceano Atlantico nord-orientale (WoRMS www.marinespecies.org). Recentemente la popolazione di *R. pulmo* nelle acque mediterranee è stata costretta a ridurre il proprio habitat di estensione a causa dell'invasione da parte di *Rhopilema nomadica* proveniente dal Mar Rosso (Herut & Galil, 2000).

R. pulmo ha una campana emisferica di colore bianco opaco (gli esemplari giovani tendono ad avere una colorazione tendente al trasparente), delle dimensioni di circa 60 cm di diametro. Ha margini ondulati di colore blu-violaceo. Le otto braccia orali sono fuse a livello prossimale e separate distalmente (AIAM www.aiamitalia.it).



Fig 1.13: *Rhizostoma pulmo* (Fonte: WoRMS www.marinespecies.org)

La specie *Rhizostoma luteum* (Quoy *et al*, 1827) è presente lungo la costa occidentale dell'Africa e del Portogallo ed anche a livello dello Stretto di Gibilterra (Prieto *et al*, 2013).

Morfologicamente *R. luteum* è simile a *R. pulmo*, ha una campana di circa 60 cm di diametro. La differenza tra le due specie risiede nella forma della braccia orali, che in *R. luteum* sono più lunghe e più robuste nella porzione prossimale, dove si fondono tra loro in uno spesso manubrio; la parte distale termina con lunghe appendici fusiformi (Prieto *et al*, 2013).

Nella famiglia *Stomolophidae* vi è il solo genere *Stomolophus*. La specie *Stomolophus meleagris* (Agassiz, 1862), viene anche definita comunemente “cannonball jellyfish” (palla di cannone). Rappresenta una delle meduse più frequenti lungo le coste sud-orientali statunitensi (Griffin & Murphy, 2011), ma è distribuita anche nel Mar del Giappone e nel Mar Cinese Meridionale. *S. meleagris* ha una campana emisferica di circa 25 cm di diametro con margini pigmentati di marrone.



Fig. 1.14: *Stomolophus meleagris* (Fonte: www.marinebio.org)

Nella famiglia *Thysanostomatidae*, l'unico genere è *Thysanostoma* (Hale, 1999); si tratta di meduse che vivono nelle acque indo-pacifiche, aventi una campana di circa 9-12 cm di diametro e con braccia orali piuttosto lunghe rispetto al corpo.

Nella famiglia *Versurigidae*, l'unico genere è *Versurigia*; queste meduse presentano una campana appiattita di circa 6-20 cm di diametro (Hale, 1999)

1.4 Ordine: Semeaostomeae

L'Ordine delle Semeaostomeae (Agassiz, 1862) è suddiviso in tre grandi famiglie *Pelagiidae*, *Cyaneidae* e *Ulmaridae*. Gli esemplari appartenenti a quest'Ordine sono distribuiti in tutti i mari del mondo. Hanno un'ampia campana discoidale con margini frastagliati. La cavità gastrovascolare è suddivisa in numerosi canali che si estendono dallo stomaco centrale al margine della campana. Le braccia orali, che circondano la bocca in posizione centrale, sono quattro, e a differenza delle *Rhizostomeae*, non sono presenti bocche accessorie a questo livello. Gran parte delle specie possiede un numero variabile di tentacoli che si dipartono dal margine della campana.

Un'altra particolarità di quest'Ordine risiede nel ciclo biologico; infatti, alcune specie non presentano la fase polipoide, ma dalla planula (liberata per riproduzione gamica) si sviluppa direttamente una giovane medusa liberamente natante (Hale, 1999).

Gli appartenenti alla famiglia *Pelagiidae* hanno una campana di circa 10-40 cm di diametro, ai margini della quale si dipartono otto o più tentacoli (Hale, 1999). Le *Pelagiidae* sono diffuse nelle acque di tutto il globo, soprattutto in quelle mediterranee, africane e lungo le coste del Brasile. Il genere *Pelagia* bypassa la fase polipoide e si sviluppa direttamente dalla planula (Mariottini, Giacco & Pane, 2008).

La specie *Pelagia noctiluca* (Forsskal, 1775) è una piccola medusa pelagica avente un ampio areale di distribuzione, solitamente risiede nelle zone tropicali, ma attraverso le correnti marine può essere trasportata anche in acque più fredde (Mariottini *et al*, 2008). Normalmente si muove liberamente in una fascia di profondità che va dalla superficie sino ai

150 m (ma è possibile riscontrarla anche al di sotto di tale fascia) (Franqueville, 1971). *P. noctiluca* si concentra maggiormente nelle acque pacifiche (in particolare lungo la costa californiana), nel Mar Cinese Orientale e Meridionale (Dong *et al*, 2010) e nelle acque mediterranee (Mariottini *et al*, 2008). Il fenomeno delle “fioriture” nel Mar Mediterraneo si verifica nei mesi autunnali lungo le coste della Tunisia e dell'Algeria (Hamza, 1990), mentre si compiono essenzialmente nei mesi estivi lungo le coste della Grecia (Manfrin & Piccinetti, 1983), della Turchia (Bingel *et al*, 1991) e di Israele (Galil *et al*, 1990). Nel Mar Adriatico questa medusa ha comportato, nei primi anni '80, diversi inconvenienti a pescatori e bagnanti, soprattutto a livello delle coste croate (Benovic, 1984).

Morfologicamente *P. noctiluca* ha una campana emisferica, a forma di cupola, con diametro di circa 3-10 cm, che termina esternamente con 16 lembi marginali di forma rettangolare, dai quali si dipartono lunghi tentacoli ricchi di nematocisti. Le braccia orali sono quattro, della lunghezza di circa 30 cm. Il colore della campana è variabile dal marrone al rosa-violaceo (Mariottini *et al*, 2008); varia in relazione con l'età della medusa (< 10 mm di diametro sono trasparenti, > 30 mm di diametro sono rosa-violaceo) (Mariottini *et al*, 2008).



Fig. 1.15: *Pelagia noctiluca* (Fonte: WoRMS www.marinespecies.org)

La maggior parte delle specie appartenenti alla famiglia *Cyaneidae*, fanno parte del genere *Cyanea*. Sono diffuse in tutte le acque del mondo, ma a differenza delle *Pelagiidae*, vivono in acque più basse e non in mare aperto; inoltre hanno un ciclo biologico con una fase polipoide e una medusoide. Un'altra caratteristica è rappresentata dal fatto che i tentacoli si dipartono a grappolo dal margine della campana (Hale, 1999).

La specie *Cyanea capillata* (Linnaeus, 1758), comunemente definita “lion's mane jellyfish” (medusa criniera di leone), presenta una grande campana discoidale (può raggiungere i 2,5 m di diametro) e centinaia di lunghi tentacoli (Costello & Colin, 1995). Il colore varia dal giallognolo al rossiccio. Vive soprattutto nelle fredde acque artiche, nella parte settentrionale dell'Oceano Atlantico e Pacifico.



Fig. 1.16: *Cyanea capillata* (Fonte: www.st-andrews.ac.uk)

Il genere più rappresentativo della famiglia *Ulmaridae* è *Aurelia*; molto diffuso in tutti i mari del globo. Presentano una campana di dimensioni variabili tra 50-400 mm e numerosi tentacoli (Hale, 1999).

La specie *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) ha una elevata capacità di adattamento alle diverse condizioni di temperatura (range tra 0°- 36°C) e di salinità (3-36 %) (Arai, 1997; Martin, 1999); perciò *A. aurita* è possibile riscontrarla pressoché in tutte le acque marine della Terra. Viene anche definita comunemente “medusa quadrifoglio” in quanto sono visibili sulla sommità della campana, quattro strutture, le gonadi, che le conferiscono la caratteristica forma.

Dal punto di vista morfologico ha una campana circolare (circa 40 cm di diametro), trasparente, con margini leggermente frastagliati, dai quali si dipartono sottili e brevi tentacoli (Henroth & Groendahl, 1985).



Fig. 1.17: *Aurelia aurita* (Fonte: www.aquariumofthebay.org)

CAPITOLO 2:

DALLA PRODUZIONE ALLA COMMERCIALIZZAZIONE DELLA MEDUSA

Nonostante in Occidente la maggior parte dei consumatori tende a considerare la medusa un prodotto alimentare “ripugnante”, in altri contesti culturali, come quello asiatico, rappresenta una prelibatezza, costituendo un enorme *business* da milioni di dollari per gli imprenditori del settore della pesca e dell'industria di trasformazione (You *et al*, 2007).

Le meduse sono consumate e sfruttate commercialmente in Cina da più di un migliaio di anni, motivo per il quale questo Paese ne è diventato il primo produttore e trasformatore (Omori & Nakano, 2001). Nella cucina tradizionale asiatica la medusa viene preparata cotta o non cotta; solitamente viene sminuzzata con olio, salsa di soia, aceto e zucchero, oppure impiegata come ingrediente di insalate miste (Li & Hsieh, 2004).

Oltre che come alimento, tale prodotto viene largamente impiegato anche nel campo della medicina tradizionale cinese, per le sue proprietà medicamentose nei confronti di artrite, ipertensione, lombalgia, mal di schiena, invecchiamento della pelle, ustioni, bronchite e asma; questi effetti benefici, alcuni dei quali scientificamente provati, sembrano essere legati alla componente collagenica che costituisce gran parte del corpo di questi invertebrati (80-90 % delle proteine totali) (Hsieh & Rudloe, 1994; You *et al* 2007). La medusa, infatti, è costituita per il 95 % di acqua e per il 4-5 % di proteine (soprattutto collagene). Gli zuccheri sono presenti soltanto in tracce ed i grassi, compreso il colesterolo, sono completamente assenti (<http://www.lagazzettadelmezzogiorno.it/notizie-nascoste/meduse-buone-anche-in-cucina-e-contro-l-ipertensione-no619007/>). Tali caratteristiche nutrizionali fanno della medusa un alimento ideale anche per il consumatore occidentale, sempre più interessato all'acquisto di prodotti salutistici e a basso contenuto calorico (Castigliero *et al*, 2009). È stato calcolato infatti che 100 gr di medusa contengono appena 20 Kcal (Li & Hsieh, 2004).

2.1 Specie di medusa impiegate a scopo alimentare

Gran parte delle meduse commestibili appartiene all'Ordine delle Rhizostomeae; in particolare le specie maggiormente commercializzate a fini alimentari appartengono a 5 famiglie, *Catostylidae*, *Rhizostomatidae*, *Lobonematidae*, *Cepheidae* e *Stomolophidae*.

Nella famiglia *Catostylidae* in particolare le specie *Catostylus mosaicus* (Quoy & Gaimard, 1827), *Crambione mastigophora* (Maas, 1903) e *Crambionella orsini* (Vanhöffen, 1888).

Nella famiglia *Rhizostomatidae*, le specie *Rhizostoma pulmo* (Macri, 1778), *Rhopilema esculentum* (Kishinuoye, 1891), *Rhopilema hispidum* (Vanhöffen, 1888), *Nemopilema*

nomurai (Kishinuoye, 1922) e *Rhopilema nomadica* (Galil & Ferguson, 1990).

Nella famiglia *Lobonematidae*, le specie *Lobonema smithii* (Mayer, 1910) e *Lobonemoides gracilis* (Light, 1914).

Nella famiglia *Stomolophidae* la specie *Stomolophus meleagris* (Agassiz, 1862).

Nella famiglia *Cepheidae* la specie *Cephea cephea* (Forskaal, 1775).

Tra queste le specie maggiormente consumate in Asia sono tre, ed appartengono alla famiglia delle *Rhizosomatidae*. Si tratta di *R. esculentum*, *R. hispidum* e *N. nomurai* (Omori & Kitamura, 2004).

La specie *R. esculentum* è sicuramente quella più sfruttata e consumata in Cina, Giappone e Corea (You *et al*, 2007), nonché quella dal prezzo di mercato più alto (Omori & Nakano, 2001).

C. mastigophora viene pescata soprattutto nella penisola malese e nell'isola di Java, *C. orsini* è presente nel Golfo del Bengala oltre che nel Golfo iraniano e nel Mar Rosso (Omori & Nakano, 2001). Per quanto riguarda *C. mosaicus* si trova nelle acque delle Filippine, della Nuova Guinea e, soprattutto, lungo le coste dell'Australia (in particolare nel Nuovo Galles del Sud) (Pitt & Kingsford, 2000); la finalità non è l'autoconsumo, in quanto in Australia non viene considerata un prodotto gastronomico, bensì l'esportazione verso i mercati asiatici (Poole *et al*, 2002).

Attualmente l'identificazione su base morfologica della medusa è alquanto complicata anche in presenza di esemplari freschi e ben conservati, in relazione all'esistenza di specie che tuttora restano criptiche. Per ovviare tale problema i commercianti del Sud-est Asiatico hanno catalogato i prodotti presenti sul mercato sulla base di peculiari caratteristiche quali la forma, le dimensioni, la consistenza e il colore, raggruppandoli in 8 tipologie principali (Omori & Nakano, 2001). In particolare si riconoscono: **tipo rosso/tipo cinese**, **tipo bianco**, **tipo sabbia**, **tipo di fiume**, **tipo di cilacap**, **tipo prigi**, **tipo semi-cinese** e **tipo a sfera**.

Fanno parte del **tipo rosso/tipo cinese**, meduse rossastre, con campana liscia di 300-600 mm di diametro; tipologia attribuibile a *R. esculentum*.

Nel **tipo bianco**, sono comprese meduse biancastre con campana di circa 500 mm di diametro ed aventi numerose escrescenze puntiformi di circa 1-2 cm. Vengono pescate in mare aperto; tale tipologia è attribuibile a *L. smithii*.

Al **tipo sabbia**, appartengono meduse con campana biancastra del diametro di circa 500 mm, caratterizzata da numerose escrescenze e macchie marroni. Vengono pescate sia a largo che lungo la costa; questa tipologia è attribuibile a *R. hispidum*.

Nel **tipo di fiume**, vi sono meduse biancastre o brunastre, aventi campana ruvida di circa 200 mm di diametro, pescate in acque salmastre, vicino alla foce dei fiumi.

Il **tipo di Cilacap**, comprende meduse dal colore lilla, con campana di circa 250 mm di diametro provvista di fini scanalature; prendono il nome dall'area geografica in cui vivono, nelle acque di Cilacap (Giava orientale).

Al **tipo Prigi**, appartengono meduse color amaranto e con grande campana (circa 400 mm di diametro). Si trovano in abbondanza presso la Baia di Prigi e Muncar, Java orientale; potrebbe trattarsi di *C. mastigophora*.

Il **tipo semi-cinese**, comprende meduse simili al tipo rosso, ma più piccole (circa 150 mm di diametro).

Nel **tipo a sfera**, vi sono meduse brunastre, con campana spessa e rigida provvista di creste marginali e scanalature caratteristiche; tipologia riferibile a *C. orsini*.

Generalmente, mentre dei **tipi cinesi e semi-cinesi** vengono commercializzate sia le braccia orali che la campana, per quanto riguarda i tipi bianchi e di sabbia, ci si limita all'utilizzo della sola campana (Omori & Nakano, 2001).

2.2 Produzione e consumo di medusa nel mondo

A causa della crescente richiesta di prodotti a base di medusa, negli ultimi anni le risorse naturali dei Paesi tradizionalmente fornitori di materia prima, quali Cina e Giappone, non riescono a soddisfare la domanda interna, rendendo necessario il ricorso all'importazione e all'acquacoltura (Omori & Nakano, 2001). Questo ha determinato un rapido sviluppo dell'attività di pesca, non solo nel Sud-Est asiatico (Filippine, Vietnam, Thailandia, Malesia, Indonesia e Birmania) ma anche in altri Paesi, quali India, Turchia, Australia, Argentina, Namibia, Russia, Regno Unito, Messico, USA e Nicaragua (Brotz, 2011; Li & Hesieh, 2004). Nei Paesi occidentali, soprattutto USA e Argentina, questa esigenza è nata essenzialmente per far fronte agli inconvenienti alla pesca locale determinati dalla presenza di abbondanti “fioriture” di medusa. In questo contesto, alcuni pescatori hanno cominciato un'attività di pesca e lavorazione delle meduse, per poi esportarle come prodotto lavorato nei Paesi asiatici (Schiariti *et al.*, 2008).

La stessa FAO ha proposto lo sviluppo di prodotti alimentari a base di medusa per limitarne la proliferazione e far fronte alla minaccia che questi animali rappresentano per gli altri comparti ittici (<http://www.fao.org/docrep/017/i3169e/i3169e.pdf>). Bisogna precisare che, seppure la grande maggioranza degli esemplari pescati in questi Paesi siano destinati ad essere esportati, una piccola parte resta nel mercato interno; recentemente, infatti, seppure in misura ridotta, alcuni Paesi occidentali hanno cominciato a guardare con interesse a questo nuovo prodotto, in relazione alle sue particolari proprietà nutrizionali, che lo rendono un alimento a bassissimo tenore calorico e quindi particolarmente adatto alle esigenze del consumatore in cerca dei cosiddetti prodotti “light”. La medusa, rientrerebbe quindi nel *trend* commerciale del

mercato alimentare moderno, sempre più attratto dai prodotti etnici e salutistici. Difatti, attualmente, la gastronomia “etnica” è oramai ben radicata sia a livello di distribuzione che di ristorazione, dando vita a un vero e proprio *business* d'affari nel mondo occidentale (Castigliero *et al*, 2009).

2.2.1 La pesca di meduse a livello mondiale

La pesca di meduse a livello commerciale è aumentata progressivamente a partire dagli anni '70, quando gli immigrati cinesi introdussero questa risorsa ittica anche in altri Paesi del Sud-Est Asiatico (Omori & Nakano, 2001). Vista l'instabilità della produzione cinese e del conseguente rapido aumento dei prezzi, gli imprenditori giapponesi incentivarono lo sviluppo tecnico della pesca e dei relativi processi di lavorazione in altri Paesi, come Thailandia, Malesia, Indonesia, Filippine, Vietnam e Myanmar (ex Birmania) (Omori & Nakano, 2001).

La pesca delle meduse è caratterizzata da notevoli fluttuazioni stagionali e la cattura è limitata solo ad alcuni mesi dell'anno che variano in base alle specie pescate e alla località di pesca. In genere, la stagione di pesca va da Marzo a Maggio e da Agosto a Novembre (Omori & Kitamura, 2004). Le condizioni atmosferiche e le maree, infatti, hanno un ruolo determinante in questo settore, poiché le meduse tendono ad affiorare in superficie solo se il mare è calmo. Nel Sud-est Asiatico, nel periodo che va da Dicembre a Febbraio in cui il clima è secco e prevalgono i venti nord-orientali e nord-occidentali che rendono il mare mosso, la pesca non viene praticata (Omori & Nakano, 2001).

Le metodologie applicate per la cattura delle meduse (Omori & Nakano, 2001) sono sostanzialmente basate su un'attività di pesca diurna, con l'ausilio di barche a motore costruite in bamboo. Solitamente vengono utilizzate reti da traino (90-100 m di larghezza X 9-10 m di altezza) (Nishikawa *et al*, 2008) oppure sono adoperate delle reti fisse provviste di un'imboccatura rettangolare posizionate verticalmente in direzione contraria alla corrente marina (Kitamura & Omori, 2010). In alcune zone resta ancora in uso un tradizionale metodo di cattura in superficie con l'ausilio di un gancio in legno o bamboo, sagomato a forma di arpione (Kitamura & Omori, 2010).

Come detto in precedenza, la specie più utilizzata in Cina è *Rhopilema esculentum* e, nella più importante zona di pesca della nazione Liaodong Bay, il quantitativo di catture annue varia da 10.000 a oltre 100.000 tonnellate (You *et al*, 2007).

Secondo Omori & Nakano (2001), a livello mondiale il quantitativo di catture di meduse si attesta approssimativamente intorno alle 321.000 tonnellate/annue.



Fig. 2.1: *pesca di meduse in Vietnam (Fonte: Nishikawa et al)*

In Occidente, lo sviluppo della pesca delle meduse è spesso nato come conseguenza di esigenze locali.

Negli USA è nata in seguito alla crisi che colpì i pescatori di gamberetti nel Golfo del Messico nei primi anni '90, (Graham *et al*, 2003). In questo contesto alcuni pescatori, utilizzarono gli aiuti degli enti locali per avviare un'attività di pesca e lavorazione di *S. meleagris*, per poi esportarlo nel Sud-Est Asiatico (Hsieh & Rudloe, 1994).

In Canada è stata studiata la possibilità di sfruttare commercialmente la specie *A. aurita*, che viene pescata nelle aree di Trinity Bay e British Columbia. Tuttavia, la valutazione del prodotto ottenuto con questa specie, effettuata in Cina, Taiwan e Florida nel 2008, ha messo in evidenza le necessità di ulteriori ricerche per trovare le condizioni ottimali di lavorazione; inoltre, sembra che il mercato asiatico prediliga meduse più grandi rispetto ad *A. aurita* (Sloan & Guun, 1985).

Anche in Argentina si sta investendo per lo sviluppo di tecnologie di lavorazione della medusa locale, *L. lucerna*, ampiamente distribuita nell'estuario del Rio de la Plata (Schiariti *et al*, 2008). Le “fioriture” di questa specie comportavano ogni anno notevoli perdite economiche per i pescatori locali (Schiariti *et al*, 2008), perciò questi ultimi hanno cominciato a valutare la possibilità di sfruttare tale specie autoctona a fini commerciali (Mianzan *et al*, 2005).

2.2.2 Le nuove tendenze: acquacoltura

Il rapido incremento delle richieste di mercato ha messo in evidenza l'effettivo problema dell'arretratezza e dell'instabilità della pesca tradizionale ed ha scaturito l'esigenza di mettere in atto tecniche di riproduzione artificiale della medusa, con l'obiettivo di promuoverne lo sviluppo commerciale, attraverso la stabilizzazione e l'incremento delle catture (You *et al*, 2007).

In alcune zone della Cina l'acquacoltura della medusa ha sostituito quella più tradizionale di gamberi, diventando un altrettanto importante fonte di reddito per i pescatori locali. L'allevamento può essere condotto secondo un sistema a ciclo “aperto” o “chiuso”.

Nel sistema a ciclo aperto le meduse vengono allevate in vasche fino a quando la campana non ha raggiunto un diametro tra 10-50 mm, per poi essere rilasciate in mare aperto ad incrementare la popolazione naturale (You *et al*, 2007). Nel sistema a ciclo chiuso le meduse sono allevate fino al raggiungimento della taglia commerciale all'interno di reti chiuse lungo zone costiere o all'interno di stagni artificiali con acqua di mare; prima del loro inserimento può essere necessario svolgere preventivamente una lotta contro i predatori/agenti patogeni, promuovere la proliferazione del plancton e garantire alle meduse un approvvigionamento naturale alimentare, spesso integrato con plancton d'allevamento o di cattura. Tutto questo garantisce il raggiungimento della taglia commerciale (campana di circa 30 cm) in 70 giorni (Xie *et al*, 2004).



Fig 2.2: acquacoltura in Cina (Fonte: www.blogs.ei.columbia.edu)

2.3 Processo di lavorazione e preparazione dei prodotti a base di medusa

Il processo di lavorazione e preparazione delle meduse è un'operazione che non richiede costi elevati ma necessita di un'esperta manodopera. Nei Paesi asiatici è considerata una vera e propria forma d'arte, affidata alla mano di “maestri” che custodiscono le procedure e le formule di lavorazione come un segreto industriale (Hsieh *et al*, 2001).

Poiché le meduse sono prodotti che deperiscono molto velocemente a temperatura ambiente, la loro trasformazione deve iniziare quando l'animale è ancora vivo (Hsieh *et al*, 1996). Gli addetti alla lavorazione, provvedono a lavarle con acqua di mare, separare le braccia orali dalla campana e raschiare quest'ultima per eliminare il muco superficiale, il materiale gonadico e l'intero contenuto gastrovascolare (Li & Hsieh, 2004).

Le parti commestibili sono rappresentate dalla campana, dalle braccia orali e dal cosiddetto

“fusto” (porzione prossimale delle braccia orali fuse tra loro). Queste tre distinte porzioni, vengono inviate alle industrie competenti che le processano separatamente e con trattamenti leggermente diversi tra loro (Nishikawa *et al*, 2008); indipendentemente dalla parte lavorata, il processo tradizionale implica un trattamento multi-fase di salatura che prevede l'utilizzo di una miscela di cloruro di sodio e allume, con modalità differenti a seconda della porzione processata. Il sale (cloruro di sodio) ha lo scopo di ridurre il tenore di acqua e mantenere il prodotto microbiologicamente stabile, mentre l'allume agisce riducendo il pH da circa 6.6 a 4.5-4.8, limitando così la crescita microbica, lo sviluppo di odori sgradevoli e allungando la *shelf-life* ed inoltre essendo un agente di indurimento, precipita le proteine conferendo una struttura costante e rigida al prodotto (Li & Hsieh, 2004). Impiegando sale ed allume singolarmente, non si otterrebbe un prodotto finale qualitativamente soddisfacente (Hsieh & Rudloe, 1994).

Le campane sono trasferite in vasche contenenti le soluzioni di sale (20-30 %) ed allume (5-10 %) e, miscelate ad intervalli di 6 ore fino al giorno successivo, in cui le si toglie dalla salamoia per ispezionarle e continuarne la lavorazione; vengono rimossi i possibili residui epidermici e asportate le parti marginali più dure. Una volta rifinite, le campane vengono prima ammassate a strati con il sale inserito tra di esse, dopodiché vengono trasferite in un'altra vasca contenente la stessa miscela di sale e allume utilizzata nella prima fase; progressivamente la concentrazione del sale della salamoia viene incrementata fino al 70 %. Infine sono irrorate con acqua per un periodo variabile da una settimana a un mese e mezzo, a seconda delle richieste di mercato, sminuzzate e confezionate in salamoia.

Le braccia orali, invece, vengono prima trasferite per almeno 4 ore in un bacino di centrifugazione contenente soltanto acqua dolce, al fine di rimuovere il muco e le nematocisti e, in seguito, trasferite per 4-5 giorni in una nuova vasca con una miscela di sale e allume a concentrazioni superiori (sale 50 %; allume 15 %), rispetto alla “*mix*” tradizionale impiegata per le campane; durante la sosta in questa vasca ad intervalli di 5 ore sono aumentate le concentrazioni di sale e allume (fino al raggiungimento del 70 % di sale e 20 % di allume). Successivamente si procede al taglio e confezionamento in salamoia delle braccia orali.

La lavorazione del “fusto” è notevolmente più semplice di quello della campana e delle braccia orali; esso viene immediatamente immerso nella miscela (sale 50 % e allume 15 %) per un periodo che va da 5 giorni a un mese e mezzo. Infine sminuzzato, confezionato e conservato in salamoia (Nishikawa *et al*, 2008).



Fig. 2.3: prodotto in salamoia acquistato al market di Prato (Fonte: FishLab)

Vista la maggiore complessità di lavorazione e i tempi più lunghi di preparazione, le campane hanno un prezzo di mercato più alto rispetto a quello delle braccia orali e del “fusto” (Omori & Nakano, 2001). Nonostante ciò la domanda del mercato giapponese è rivolta soprattutto a questa porzione, mentre in Cina si è verificato un incremento del consumo delle braccia orali (Kitamura & Omori, 2010), dalle quali si ottiene (a costi inferiori) un prodotto finale pressoché identico (Nishikawa *et al*, 2008), con il 60-70 % di umidità e il 16-25 % di sale con una resa di circa il 7-10 % del peso grezzo (Li & Hsieh, 2004).

Un prodotto finito deve essere in grado di rispondere alle richieste di mercato, soddisfacendo le caratteristiche identificative di qualità espresse in tabella 2.1 (vedi Appendice 1).

Le componenti trattate, vengono poi sminuzzate e commercializzate come prodotti in salamoia in appositi contenitori e possiedono una *shelf-life* piuttosto lunga (1 anno a temperatura ambiente; più di 2 anni se il prodotto è mantenuto a temperature di refrigerazione). Il congelamento altera il prodotto stesso, che si asciuga e raggrinzisce. La conservazione prolungata a temperature elevate può causare una perdita di nitidezza o il deterioramento del prodotto (Omori & Nakano, 2001).

Prima del consumo, le meduse devono essere dissalate e reidratate con acqua per almeno 60 minuti (Li & Hsieh, 2004). Poiché tale processo rappresenta una “perdita di tempo” per il consumatore moderno, il mercato ha cominciato ad offrire una crescente disponibilità di prodotti “*Ready to eat*” a base di meduse e con ampia varietà di gusti e salse (Armani *et al*, 2012a).

Il prodotto “*Ready to eat*”, quindi, prima di essere venduto è stato precedentemente desalato e reidratato, ha consistenza croccante ed in genere è provvisto di salse di accompagnamento (salsa di soia, wasabi o mostarda) e confezionato in contenitori di materiale plastico (polietilene/poliestere laminato), che ne conserva il colore, la freschezza, l'aroma e il sapore (Poole *et al.*, 2002).

2.3.1 Preparazione dei prodotti “*Ready to eat*”

La preparazione dei prodotti “*Ready to eat*” si articola in 6 fasi, lavaggio, riscaldamento e raffreddamento, condizionamento, parziale asciugatura, sterilizzazione e confezionamento.

Lavaggio: le meduse, preconfezionate secondo il metodo classico dopo l'iniziale desalatura per immersione in acqua per 24 ore sono sottoposte a lavaggi seriali con acido acetico diluito serialmente.

Riscaldamento e raffreddamento: al termine della precedente fase, le meduse vengono brevemente riscaldate a 60°C e successivamente raffreddate a temperatura ambiente.

Condizionamento: consiste nell'aggiungere al prodotto una miscela a base di sale, zucchero, glutammato monosodico (E621) ed altre sostanze in grado di legare le molecole d'acqua.

Parziale asciugatura: trascorse 1-2 ore, dopo l'allontanamento della soluzione si procede con l'asciugatura e l'eventuale aggiunta di condimento.

Sterilizzazione e confezionamento: tramite esposizione del prodotto ai raggi UV. e successivo confezionamento sottovuoto.



Fig. 2.4: prodotti “*Ready to eat*” acquistati al market di Prato. Visibile la dicitura Hai Zhe (medusa) Tou (cappello) (Fonte: FishLab)

CAPITOLO 3:

NORMATIVA IGIENICA, TRACCIABILITÀ E ETICHETTATURA DEI PRODOTTI DELLA PESCA

Per garantire la sicurezza degli alimenti ai consumatori e salvaguardare il settore alimentare da crisi ricorrenti (vedi BSE, diossina, influenza aviaria, etc), l'UE e, l'Italia come Paese membro, hanno incentrato nel corso degli ultimi anni, una forte attenzione verso la sicurezza alimentare (*food safety*). La rivisitazione del quadro normativo alimentare con l'attuazione di un sistema in grado di garantire ai consumatori prodotti alimentari sicuri lungo l'intero percorso della filiera produttiva (*from farm to fork*), ha permesso di abbandonare il precedente approccio settoriale e verticale. Attualmente, i principi generali sui quali verte la nuova legislazione comunitaria sono:

- controlli integrati lungo tutta la catena alimentare;
- interventi basati sull'analisi del rischio;
- responsabilità primaria dell'operatore del settore per ogni prodotto da lui realizzato, trasformato, importato, commercializzato o somministrato;
- rintracciabilità dei prodotti lungo la filiera;
- consumatore come parte attiva della sicurezza alimentare

3.1 Sicurezza alimentare nell'UE

Le prime valutazioni in tema di sicurezza alimentare risalgono al 1997 con il "*Libro verde della Commissione sui principi generali della legislazione in materia alimentare dell'UE*" che successivamente, nel 2000, è stato sostituito dal "*Libro bianco sulla sicurezza alimentare*". Tali documenti fondamentali hanno ispirato l'impianto normativo comunitario in materia di sicurezza alimentare a partire dal **Regolamento (CE) n° 178/2002** (il cosiddetto "*General Food Law*"), che introduce il principio fondamentale di un approccio integrato di filiera, estendendo il campo di applicazione della disciplina dell'igiene dei mangimi e al settore primario, e non solo alle fasi ad esso successive; inoltre il sopra citato Regolamento rende obbligatoria la rintracciabilità di alimenti e mangimi (in un'ottica di legislativa orizzontale) intesa come la "*possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione alimentare o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione*". Lo scopo è quello di far sì che tutto ciò che entra nella catena alimentare (mangimi, animali vivi destinati al consumo umano, alimenti, additivi, etc...) conservi traccia della propria storia, seguendone il percorso che va dalle materie prime

fino all'erogazione al consumatore finale. La rintracciabilità consiste nell'utilizzare le "impronte", ovvero la documentazione raccolta dai vari operatori coinvolti nel processo di produzione, per isolare un lotto produttivo in caso di emergenza, e consentire al produttore e agli organi di controllo che hanno il dovere di vigilare sulla sicurezza alimentare del cittadino, di gestire e controllare eventuali situazioni di pericolo attraverso la conoscenza dei vari processi produttivi; fino al 2005 erano rintracciabili solo alcuni prodotti, quali carne, pesce e uova. Dal 1° Gennaio 2006, con l'entrata in vigore del "Pacchetto igiene", l'obbligo della rintracciabilità è stato esteso a tutti i prodotti agroalimentari, il che consente di individuare qualsiasi prodotto in ognuna delle fasi del ciclo produttivo.

La responsabilizzazione dell'operatore del settore alimentare (OSA) è un punto cardine della nuova legislazione alimentare; difatti, il Reg. (CE) 178/2002 riporta la seguente dicitura *"operatore del settore alimentare è la persona fisica o giuridica responsabile di garantire il rispetto delle disposizioni della legislazione alimentare nell'impresa alimentare posta sotto il suo controllo"*. Lo stesso Regolamento prevede che *"spetti agli operatori del settore alimentare e dei mangimi garantire che nelle imprese da essi controllate, gli alimenti o i mangimi soddisfino le disposizioni della legislazione alimentare, inerenti alle loro attività in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione e verificare che tali disposizioni siano soddisfatte"*. Dunque l'OSA diventa legalmente responsabile della conformità igienico-sanitaria degli alimenti che produce. Nel Reg. (CE) 178/2002 si fa inoltre riferimento a come tutto ciò sia attuato, applicando nell'impresa alimentare, l'autocontrollo. Se inoltre un operatore ritiene che un alimento sia nocivo per la salute dell'uomo e degli animali, deve avviare immediatamente le procedure di ritiro dal mercato informandone le autorità competenti e, laddove il prodotto possa già essere arrivato al consumatore, esso ne deve informare i consumatori ed essere in grado di richiamare i prodotti già forniti (Reg. CE 178/2002).

In ambito comunitario con il Regolamento (CE) 178/2002, è stato introdotto il concetto di *"risk analysis"* (analisi del rischio). Per analisi del rischio si intende un processo costituito da 3 fasi: valutazione del rischio, gestione del rischio e comunicazione del rischio. Queste tre componenti sono interconnesse tra loro (Bergamo & Moriconi, 2012).

La valutazione del rischio (*risk assessment*) si basa sugli elementi scientifici a disposizione e deve essere svolta in modo autonomo, indipendente, obiettivo e trasparente. Questi aspetti sono fondamentali per effettuare il primo indispensabile passaggio per una corretta analisi del rischio e costituisce la componente scientifica dell'intero processo. La valutazione del rischio è un processo costituito da 4 fasi: individuazione del pericolo, caratterizzazione del pericolo, valutazione dell'esposizione al pericolo e caratterizzazione del rischio. L'individuazione del

pericolo consiste nell'accertamento per ogni pericolo veicolabile con l'alimento, del possibile legame causale con una patologia nell'uomo. La caratterizzazione del pericolo consiste nel calcolare la dimensione dell'esposizione al pericolo (grado di presenza del pericolo nell'alimento, quantità di alimento consumato, etc...). La valutazione dell'esposizione al pericolo consiste nel determinare la relazione tra l'unità di esposizione al pericolo e l'unità di risposta (rapporto dose-risposta, potere patogeno o tossicologico dell'agente, sensibilità dell'ospite, etc...). La caratterizzazione del rischio consiste nel descrivere la natura e la grandezza del rischio, includendo anche le incertezze di analisi, tramite l'elaborazione di una stima quantitativa del rischio a cui sono soggetti i consumatori o un *target* di questi. Rappresenta il punto finale del processo di valutazione tramite cui si riesce a definire il pericolo.

La gestione del rischio (*risk management*), intesa come direzione e controllo per gestire operativamente una situazione di rischio; tiene conto dei risultati della valutazione del rischio allo scopo di raggiungere gli obiettivi generali in materia di legislazione alimentare. Secondo il principio di precauzione, qualora in circostanze specifiche e a seguito della valutazione delle informazioni disponibili venga individuata la possibilità di effetti dannosi per la salute, ma permanga una situazione di incertezza sul piano scientifico, possono essere adottate, in attesa di ulteriori informazioni scientifiche per una valutazione più esauriente del rischio, le misure provvisorie di gestione del rischio, necessarie per garantire il livello elevato di tutela della salute che la Comunità persegue. Tali misure prevedono le sole restrizioni al commercio, e vengono riesaminate entro un periodo ragionevole, a seconda della natura del rischio e del tipo di informazioni scientifiche necessarie per risolvere la situazione di incertezza scientifica e per realizzare una valutazione del rischio più esauriente.

La comunicazione del rischio ha come fine quello di assistere i consumatori e i cittadini in generale ha comprendere una logica che sta dietro una decisione basata sul rischio, affinché questi possano formulare un giudizio equilibrato che rispecchi le prove oggettive concernenti la questione in esame, in relazione ai loro interessi e valori. La comunicazione del rischio non dovrebbe essere considerata un tentativo di convincere o persuadere le persone ad adottare il giudizio del comunicatore in merito alla tollerabilità o accettabilità dei rischi. Piuttosto è il tentativo di aiutare le persone a formulare giudizi più informati e consentire loro di agire di fronte ai rischi presenti nella loro vita. Una comunicazione del rischio efficace può fornire un valido contributo al successo di un programma di gestione del rischio completo e responsabile.

I principi della comunicazione del rischio consistono nella pubblicazione di tutti i documenti fondamentali, in comunicazioni comprensibili, utilizzabili e tempestive, dialogo tra

valutatori, gestori del rischio con gli operatori del settore e comprensione delle esigenze e preoccupazioni dei consumatori.

Il Regolamento (CE) 178/2002 istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), che a partire dal 2005 ha sede a Parma. Essa costituisce una fonte indipendente di informazione e garantisce la comunicazione dei rischi al pubblico. L'EFSA ha inoltre il compito di coordinare la valutazione dei rischi ed identificare i rischi emergenti, fornire consulenza scientifica e tecnica alla Commissione, anche nell'ambito delle procedure di gestione delle crisi, raccogliere e pubblicare dati scientifici nei settori della sicurezza alimentare, istituire delle reti europee di organismi attivi nel settore della sicurezza alimentare. In questo contesto normativo le emergenze vengono gestite attraverso la rete informatica RASFF (*Rapid alert system for food and feed*), che mette in comunicazione gli Stati membri, la Commissione e l'EFSA e consente scambi di informazioni riguardanti le misure necessarie a limitare l'immissione sul mercato o a ritirare gli alimenti dal mercato, coordinare gli interventi compiuti con esperti per regolamentare l'utilizzazione degli alimenti, il respingimento di una partita di prodotti alimentari ad un posto di frontiera dell'UE (www.salute.gov.it).

Con il cosiddetto "Pacchetto igiene", costituito dal **Regolamento (CE) n° 852/2004**, dal **Regolamento (CE) n° 853/2004**, dal **Regolamento (CE) n° 854/2004** e dal **Regolamento (CE) n° 882/2004**, il quadro giuridico della sicurezza alimentare si è completato con le nuove norme sui requisiti igienico-sanitari e sul sistema di controlli ufficiali di alimenti e mangimi. Il "Pacchetto igiene", nel suo complesso, si applica alla produzione vegetale (primaria e trasformazione), animale (primaria e trasformazione) ed a quella dei mangimi. Entrato in vigore il 1° Gennaio 2006.

Il Regolamento (CE) 852/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari; non si applica alla produzione primaria per uso domestico privato, né alla preparazione e conservazione di alimenti per uso domestico privato. Tale Regolamento stabilisce in particolare, quanto segue:

- requisiti generali e specifici in materia di igiene degli alimenti, validi anche per la produzione primaria;
- analisi dei pericoli e dei punti critici di controllo e conferma del sistema HACCP come strumento di analisi e controllo delle condizioni di igiene e sicurezza delle produzioni alimentari;
- rimangono in vigore i manuali di buona prassi elaborati ai sensi della Direttiva 93/43/CEE;
- viene promossa l'elaborazione e la divulgazione di manuali di buona prassi comunitari e nazionali, la cui applicazione rimane comunque volontaria.

Il Regolamento (CE) 853/2004 stabilisce norme specifiche in materia di igiene degli alimenti di origine animale: carni (ungulati domestici, pollame e lagomorfi, selvaggina di allevamento e selvatica, prodotti a base di carne), molluschi bivalvi vivi, prodotti della pesca, latte e prodotti a base di latte, ovo prodotti, cosce di rana e lumache, grassi animali trasformati, gelatine, collagene. Non si applica alla produzione primaria per consumo domestico. Tale Regolamento stabilisce quanto segue:

- gli stabilimenti adibiti alle lavorazioni di prodotti animali devono essere riconosciuti dalle autorità nazionali competenti. Tale obbligo non si applica agli stabilimenti che esercitano unicamente attività di produzione primaria, trasporto, magazzinaggio di prodotti che non vanno stoccati a temperatura controllata;
- i prodotti di origine animale devono essere contrassegnati, nei casi previsti, da un apposito bollo sanitario apposto ai sensi del Regolamento (CE) 854/2004;
- devono essere redatti elenchi di Paesi terzi dai quali sono consentite le importazioni di prodotti animali. Il Regolamento stabilisce i requisiti di base per l'ammissione di un determinato Paese terzo nel suddetto elenco; sono previste disposizioni specifiche per l'importazione di prodotti della pesca; i gestori dei macelli devono ottenere informazioni che consentano la rintracciabilità per le carni di tutte le specie da loro trattate, eccetto la selvaggina selvatica;
- vengono definite le condizioni di lavorazione, stoccaggio, trasporto dei diversi tipi di prodotti di origine animale, precisando anche le temperature a cui tali operazioni devono essere effettuate;

Il Regolamento (CE) 854/2004 stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. Tale Regolamento stabilisce quanto segue:

- requisiti per il riconoscimento degli stabilimenti da parte delle autorità competenti;
- obbligo per gli operatori del settore alimentare di fornire alle autorità tutta l'assistenza richiesta nell'esecuzione del controllo;
- i controlli sono basati sui principi del sistema HACCP;
- compiti e responsabilità del veterinario ufficiale nel controllo delle carni fresche;
- modalità e frequenza dei controlli da parte delle autorità competenti riguardo ai seguenti alimenti di origine animale: molluschi bivalvi vivi, prodotti della pesca, latte e prodotti da esso derivati;
- sanzioni in caso di mancato rispetto degli obblighi fissati dal Regolamento stesso;
- completamento delle regole per l'importazione di prodotti di origine animale da Paesi terzi stabilite dal Regolamento (CE) 853/2004.

Il Regolamento (CE) 882/2004 è relativo ai controlli ufficiali destinati a verificare la conformità della normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali. Non si applica ai controlli ufficiali volti a verificare la conformità alle regole sull'organizzazione comune del mercato dei prodotti agricoli. Gli obiettivi sono quelli di prevenire o ridurre ad un livello accettabile i rischi derivati dall'ambiente per la salute umana ed animale, nonché garantire la trasparenza nel mercato degli alimenti e dei mangimi e la tutela degli interessi dei consumatori. Il Regolamento stabilisce in particolare quanto segue:

- obblighi per i Paesi comunitari e scopi dei controlli ufficiali in materia di mangimi e alimenti;
- criteri operativi per le autorità competenti designate dai Paesi membri dell'UE per tali controlli;
- accessibilità delle informazioni di pubblico interesse;
- tutela delle informazioni soggette a segreto professionale;
- requisiti dei metodi di campionamento e analisi;
- elaborazione di misure attuate in caso i controlli rivelino rischi per la salute dell'uomo o degli animali;
- completamento delle disposizioni della Direttiva 97/78/CEE in materia di controlli sui prodotti animali provenienti da Paesi terzi, con riferimento ai mangimi ed ai prodotti di origine non animale importati da Paesi non facenti parte dell'UE;
- istituzione di laboratori comunitari a cui i laboratori nazionali possono fare riferimento nella loro attività;
- misure amministrative in materia di: elaborazione di Piani nazionali di controllo, formazione del personale addetto ai controlli, controlli da effettuarsi nei Paesi comunitari ed extracomunitari, sanzioni a livello comunitario.

3.2 Normativa comunitaria riguardante i prodotti della pesca

I Regolamenti (CE) 178/2002, 852/2004, 853/2004, 854/2004 e 882/2004 hanno costituito il punto di partenza della nuova legislazione alimentare; si tratta di norme, strettamente interconnesse tra loro, di tipo orizzontale, che abbracciano trasversalmente tutte le produzioni alimentari e, tra queste, anche il comparto ittico. Una prima differenza tra vecchia e nuova normativa consiste nell'estensione del controllo igienico-sanitario anche alla produzione primaria, che nell'ambito dei prodotti della pesca, viene definita come "*allevamento, pesca, raccolta dei prodotti vivi della pesca in vista dell'immissione sul mercato, operazioni connesse se svolte a bordo di navi da pesca (macellazione, dissanguamento, decapitazione, eviscerazione, taglio pinne, refrigerazione e confezionamento) e trasporto e magazzinaggio di*

prodotti vivi o la cui natura non sia stata alterata fino al primo stabilimento" (Regolamento CE 853/2004). Per produzione primaria in relazione ai molluschi bivalvi vivi si intende invece *"la produzione, la raccolta e le operazioni connesse che hanno luogo prima che i molluschi bivalvi vivi arrivino ad un centro di spedizione o ad un centro di depurazione o a uno stabilimento di trasformazione"* (Regolamento CE 853/2004). Il pescatore diventa quindi a tutti gli effetti un operatore del settore alimentare e i prodotti, se destinati al consumo umano, diventano alimenti dal momento della raccolta (AA. VV. Manuale per buona prassi igienica per la produzione primaria-attività di pesca, 2009). Perciò, gli operatori della pesca e della molluschicoltura che effettuano la produzione primaria sono tenuti a rispettare sia i requisiti generali di igiene dell'allegato I del Regolamento (CE) 852/2004 che i requisiti specifici di igiene dell'allegato III, sezione VII e VIII del Regolamento (CE) 854/2004.

I principi del sistema HACCP non sono ancora applicabili su base generalizzata alla produzione primaria; pertanto gli operatori di tale settore possono ricorrere all'uso di manuali di corretta prassi igienica contenenti informazioni sui pericoli che possono insorgere e sulle azioni di controllo dei pericoli nella produzione primaria e nelle operazioni associate (Sellitto & Cacace, 2007).

Il concetto di produzione primaria non veniva considerato infatti nella precedente Direttiva 91/493/CEE (recepita in Italia con D. Lgs 531/92) che ha costituito il riferimento normativo del settore per oltre 15 anni, e che è stata abrogata dalla Direttiva 2004/41/CEE (recepita in Italia con D. Lgs 193/2007, il quale ha integrato a pieno titolo il "Pacchetto igiene" nell'ordinamento italiano).

Un'altra significativa differenza risiede nella definizione stessa di prodotto della pesca; nella nuova normativa (Regolamento CE 853/2004) si intendono *"tutti gli animali marini e d'acqua dolce (ad eccezione dei molluschi bivalvi vivi, echinodermi vivi, tunicati vivi, gasteropodi marini vivi e di tutti i mammiferi, rettili e rane), selvatici o d'allevamento e tutte le forme, le parti e i prodotti commestibili di tali animali"*.

Nell'ambito della vecchia e della nuova normativa restano invariate le definizioni relative ai prodotti della pesca freschi, preparati e trasformati:

- prodotti della pesca 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 della pesca preparati: *"i prodotti della pesca non trasformati sottoposti ad una operazione che ne abbia modificato l'integrità anatomica, quali l'eviscerazione, la decapitazione, l'affettatura, la filettatura e la tritatura"*;

- prodotti della pesca trasformati: "*i prodotti trasformati risultanti dalla trasformazione di prodotti della pesca o dall'ulteriore trasformazione di detti prodotti trasformati*".

L'allegato III del Regolamento (CE) 853/2004, alla sezione VII e VIII, riporta i requisiti per i molluschi bivalvi vivi e per i prodotti della pesca:

- i prodotti della pesca mantenuti vivi devono essere mantenuti a una temperatura e in condizioni che non pregiudichino la sicurezza alimentare o la loro vitalità;
- i prodotti freschi non imballati devono essere conservati sotto ghiaccio (reimesso ogniqualvolta sia necessario) in strutture adeguate, quelli imballati devono essere refrigerati a una temperatura che si avvicini a quella del ghiaccio fondente;
- le operazioni di eviscerazione e taglio devono essere effettuate igienicamente, il più rapidamente possibile dopo la cattura o lo sbarco, con continui e accurati lavaggi con acqua potabile o, a bordo delle navi, con acqua pulita;
- i prodotti della pesca interi ed eviscerati possono essere trasportati e conservati in acqua refrigerata a bordo delle navi;
- gli stabilimenti per la lavorazione e la conservazione di prodotti congelati devono disporre di installazioni con capacità frigorifera in grado di ridurre rapidamente la temperatura non superiore a -18°C al centro del prodotto, di mantenere i prodotti della pesca ad una temperatura non superiore a -18°C e disporre di strumenti per misurare e registrare la temperatura dei prodotti e dei locali;
- i prodotti della pesca congelati, eccetto i pesci congelati in salamoia destinati alla fabbricazione di conserve, devono essere mantenuti, durante il trasporto, a una temperatura stabile, non superiore a -18°C , in ogni parte della massa, con eventuali brevi fluttuazioni verso l'alto di 3°C al massimo;
- i vani carico nei quali i prodotti della pesca freschi sono conservati sotto ghiaccio devono essere costruiti con materiali impermeabili e garantire che l'acqua di fusione non rimanga a contatto con i prodotti;
- quando i prodotti della pesca sono confezionati a bordo delle navi, gli operatori del settore alimentare devono garantire che il materiale di confezionamento non sia fonte di contaminazione, sia depositato in modo tale da non essere esposto al rischio di contaminazione, se destinato ad essere riutilizzato, sia facile da pulire e, se del caso, da disinfettare.

Sempre sulla base dello stesso Regolamento (CE) 853/2004 è possibile immettere sul mercato solo prodotti della pesca e molluschi bivalvi vivi preparati e/o manipolati in uno stabilimento riconosciuto dall'autorità competente. Gli stabilimenti soggetti a riconoscimento

sono:

- navi frigorifero e navi officina;
- centri di depurazione e spedizione di molluschi bivalvi vivi;
- stabilimenti operanti in regime di freddo artificiale che effettuano una o più delle seguenti operazioni: cernita, frazionamento, ghiacciatura e preparazione dei prodotti della pesca compresi i molluschi refrigerati, congelati o surgelati; depositi frigoriferi per la conservazione dei prodotti refrigerati e congelati;
- stabilimenti di trasformazione che effettuano sterilizzazione, cottura, essiccazione, affumicamento, salagione, marinatura, etc...
- mercati all'ingrosso e aste in cui i prodotti della pesca vengono venduti;
- stabilimenti frigorifero che producono carne di pesce separata meccanicamente;
- stabilimenti che effettuano esclusivamente operazioni di riconfezionamento o associate ad altre operazioni di porzionatura, taglio, etc...

Inoltre, viene introdotto l'obbligo del "marchio di identificazione" nei prodotti della pesca, che va a sostituire quello che nella maggior parte delle vecchie norme verticali era chiamato "bollo sanitario" o "contrassegno di identificazione". Il marchio deve essere apposto direttamente sul prodotto o sull'involucro o sull'imbballaggio o essere stampato su un'etichetta apposita; il marchio può consistere anche in una targhetta inamovibile di materiale resistente, leggibile e indelebile; deve essere chiaramente esposto in modo da poter essere controllato. Tale marchio deve altresì indicare il nome del Paese dove è situato lo stabilimento o per esteso o tramite le due lettere del codice ISO e il numero di riconoscimento dello stabilimento (Regolamento CE 853/2004).

La valutazione della freschezza di tali prodotti da parte degli operatori del settore alimentare è indispensabile sia per quanto riguarda gli aspetti sanitari che quelli commerciali. Il "Pacchetto igiene" attribuisce importanza all'approccio sensoriale per l'accertamento della freschezza (più precisamente dello stato di conservazione) dei prodotti ittici; in particolare, il capitolo IV della sezione VIII del Regolamento (CE) 853/2004 dispone che *"gli operatori del settore alimentare effettuino un esame organolettico per garantire che i prodotti della pesca soddisfino tutti i criteri di freschezza"*. Parimenti, l'allegato III del Regolamento (CE) 854/2004 prevede che i controlli ufficiali sui prodotti della pesca *"comprendano almeno controlli organolettici a campione effettuati in tutte le fasi di produzione, lavorazione e distribuzione, con lo scopo di verificare il rispetto dei criteri di freschezza, e quindi di verificare che i prodotti della pesca superino almeno i livelli minimi di criteri di freschezza stabiliti conformemente alla normativa comunitaria"*.

Con l'emanazione del Regolamento (CE) 2046/96 e successive modifiche viene

considerato un ampio numero di specie ittiche in relazione al fatto che la deteriorabilità dei prodotti della pesca è influenzata da molteplici fattori di tipo biochimico, metabolico e nutrizionale legati alla specie.

3.3 Etichettatura degli alimenti a livello comunitario

Le crescenti esigenze dei consumatori in materia di sicurezza alimentare, trasparenza e rintracciabilità dei prodotti, si sono tradotte nella necessità, a livello europeo, di armonizzare le norme relative all'etichettatura, attraverso l'attuazione di norme comunitarie.

L'etichettatura di un prodotto, rappresenta una sorta di carta d'identità dello stesso, un ponte tra produttore e consumatore, e per questa sua funzione deve pertanto essere redatta in modo chiaro ed esaustivo. Le principali finalità dell'etichettatura sono:

- fornire una corretta informazione sulle caratteristiche del prodotto;
- non indurre in inganno il consumatore su caratteristiche e/o proprietà che il prodotto non possiede;
- permettere di valutare correttamente il rapporto tra la qualità del prodotto e il prezzo di vendita;
- garantire la correttezza delle operazioni commerciali e la libera circolazione dei prodotti alimentari sui mercati comunitari e internazionali;
- promuovere commercialmente il prodotto stesso.

Con l'emanazione del Regolamento (UE) 1169/2011, entrato in vigore dal 13 Dicembre del 2014, sull'etichetta degli alimenti preconfezionati devono essere visibili e ben leggibili le seguenti informazioni:

- la denominazione dell'alimento (accanto alla denominazione deve essere indicato anche lo stato fisico nel quale si trova il prodotto o lo specifico trattamento che ha subito ad es. "in polvere", "surgelato", "ricongelato", "affumicato", "liofilizzato"). Per i prodotti congelati prima della vendita e che sono venduti decongelati è obbligatorio riportare, accanto alla denominazione del prodotto, l'indicazione "decongelato";
- l'elenco degli ingredienti in ordine decrescente di peso in rapporto al prodotto. Deve essere evidenziata la presenza di allergeni, tramite caratteri tipografici con dimensione, stile o colore diverso rispetto agli altri ingredienti. Anche i prodotti sfusi devono riportare obbligatoriamente l'indicazione della presenza degli allergeni che troveremo segnalata anche sui prodotti somministrati nei ristoranti, mense, bar, etc... Alcuni allergeni sono: cereali contenenti glutine, pesce e prodotti a base di pesce, crostacei e prodotti a base di crostacei, uova e prodotti a base di uova, latte e prodotti a base di latte, molluschi e prodotti a base di molluschi, etc... Nel caso di presenza di "oli vegetali" o "grassi vegetali" vi è un apposito elenco che ne indica l'origine specifica (es. olio di palma, olio di cocco, grassi idrogenati,

etc...);

- durabilità del prodotto. Sulla confezione dell'alimento si possono distinguere due diverse indicazioni: la data di scadenza, nel caso di prodotti molto deperibili, la data è preceduta dalla dicitura "Da consumarsi entro il" che rappresenta il limite entro il quale il prodotto non deve essere consumato; il termine minimo di conservazione, nel caso di alimenti che possono essere conservati più a lungo, prima della data vi è la dicitura "Da consumarsi preferibilmente entro il" che indica che il prodotto, oltre la data riportata, può aver modificato alcune caratteristiche organolettiche come il sapore e l'odore ma può essere consumato senza rischi per la salute;
- condizioni di conservazione ed uso. Devono essere indicate per consentire una conservazione ed un uso adeguato dell'alimento dopo l'apertura della confezione;
- paese d'origine e luogo di provenienza. Questa indicazione, già obbligatoria per alcuni prodotti (carni bovine, pesce, miele, frutta e verdura, olio extravergine d'oliva), viene estesa anche a carni fresche e congelate della specie suina, ovina, caprina e avicola;
- dichiarazione nutrizionale. Sono obbligatorie indicazioni su: valore energetico, grassi, acidi grassi saturi, carboidrati, zuccheri, proteine e sale.
- in merito alla responsabilità, chi appone il proprio nome o ragione sociale o marchio sull'alimento destinato al consumatore finale, sia esso il produttore o il venditore è responsabile della completezza e della veridicità delle informazioni riportate in etichetta. Indicazione dell'indirizzo della sede legale del produttore (non è più sufficiente il solo comune di appartenenza), mentre diventa facoltativa l'apposizione della sede dello stabilimento di produzione;
- quantità al netto.

Gli alimenti commercializzati sfusi o preincartati soggiacciono a regole di etichettatura meno restrittive rispetto a quelle dei prodotti preconfezionati, finalizzate a facilitare le operazioni di vendita garantendo, al contempo, l'informazione e la tutela del consumatore. Le indicazioni obbligatorie per questa categoria di prodotti sono:

- denominazione di vendita;
- elencazione degli ingredienti, con l'eventuale aggiunta dei relativi allergeni;
- modalità di conservazione per i prodotti deperibili (quando necessario);

Tali informazioni devono essere apposte sul prodotto e/o sulla confezione che lo contiene e/o sul banco di vendita.

3.4 Etichettatura dei prodotti ittici

Per la normativa riferita all'etichettatura dei prodotti ittici si deve fare riferimento alle indicazioni dell'art. 58 del Regolamento (CE) 1224/2009 e dell'art. 68 del Regolamento (CE)

404/2011. Recentemente (13 Dicembre 2014) è entrato in vigore il Regolamento (UE) 1379/2013 (che abroga il Regolamento CE 104/2000).

In caso di vendita al consumatore finale di prodotti della pesca e dell'acquacoltura (siano essi freschi o congelati) tra le informazioni da riportare obbligatoriamente: a) in etichetta art. 35 Reg. UE 1379/2013); b) o marchio adeguato (art. 68 del Regolamento CE 404/2011); c) o contrassegno o etichettatura adeguati, e per i prodotti non preimballati cartelloni pubblicitari o *poster* (art. 35 del Regolamento UE 1379/2013) vi sono:

- la denominazione commerciale della specie, secondo la nomenclatura prevista dai Decreti nazionali;
- il nome scientifico. Il nome scientifico può essere fornito dai commercianti al dettaglio ai consumatori tramite cartelloni pubblicitari o *poster*;
- il metodo di produzione, in particolare mediante i termini: "...pescato...", "...pescato in acque dolci..." e "...allevato...";
- la zona in cui il prodotto è stato catturato o allevato; l'indicazione della zona di cattura, con il solo riferimento alla definizione della Zona FAO è ammessa tra operatori commerciali ma non in fase di vendita al consumatore finale (Circolare 27 Maggio 2002 n° 21329). In aggiunta l'operatore può indicare una zona di cattura o di produzione più precisa;
- per i prodotti pescati in mare, venduti al consumatore finale, si devono indicare le Zone FAO di cattura con la relativa sottozona o divisione, ove presente, e la denominazione di tale zona, in termini comprensibili per il consumatore (vedi fig. 3.4a e 3.4b);

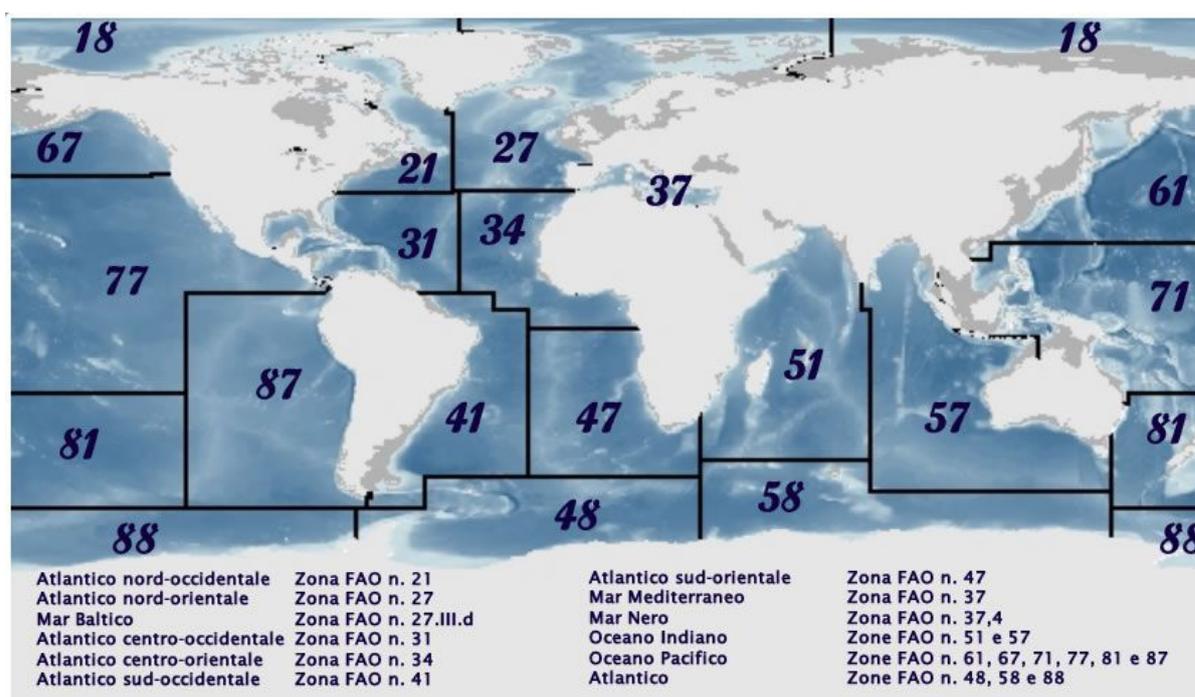
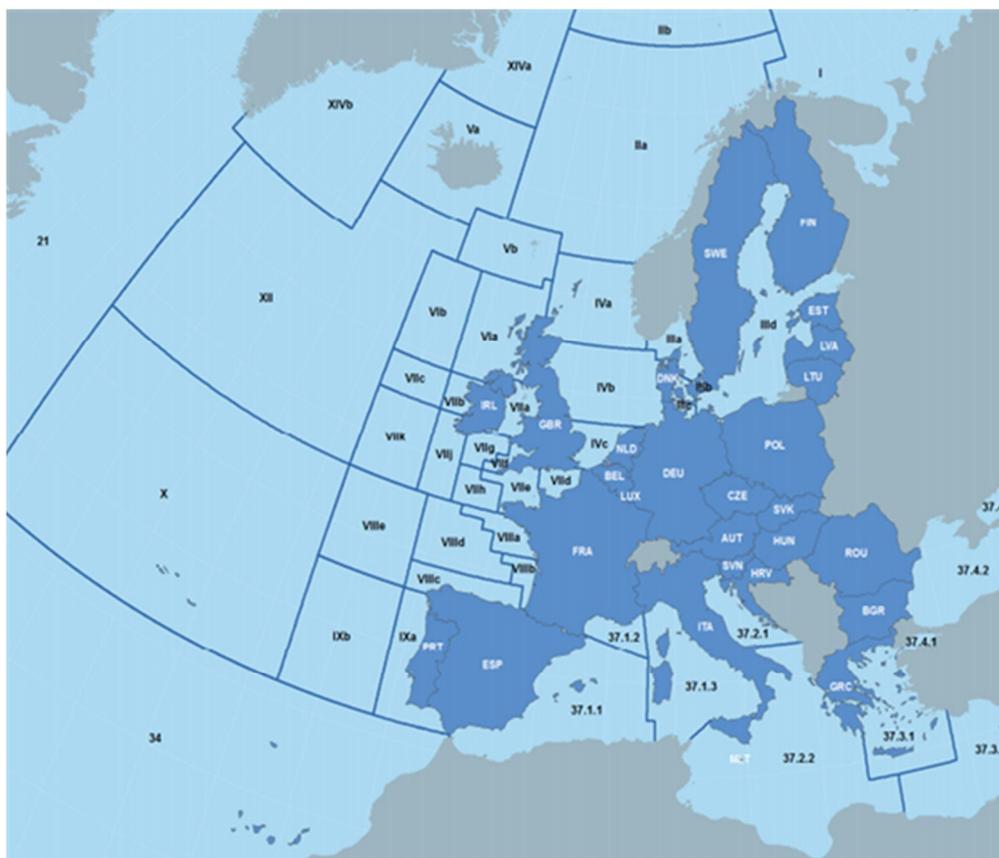


Fig. 3.4a: zone di pesca FAO (Fonte: www.asdomar.it)



Names of Sub-areas and Divisions of FAO fishing areas 27 and 37

Fig. 3.4b: sottozone 27 e 37 FAO (Fonte: www.c2p3.it)

- nel caso di prodotti pescati in acque dolci va indicato il nome dello Stato membro o Paese terzo di origine del prodotto e la menzione del corpo idrico di origine dello Stato membro o del Paese terzo di origine del prodotto;
- in caso di prodotti di allevamento, va riportato per esteso il nome del Paese ove ha avuto luogo la fase finale di sviluppo del prodotto ittico;
- la categoria di attrezzi da pesca usati nella cattura di pesci (es. reti da traino, reti da circuizione e reti da raccolta, etc...);
- se un prodotto della pesca o dell'acquacoltura è stato precedentemente congelato, e poi scongelato, il termine "scongelato" deve essere riportato in etichetta. L'assenza della dicitura "scongelato", a livello della vendita al dettaglio, indica che i prodotti della pesca e dell'acquacoltura non sono stati precedentemente congelati e quindi scongelati; l'indicazione relativa allo stato fisico del prodotto è prevista se l'omissione di tale indicazione può creare confusione nell'acquirente. L'esposizione e la vendita del prodotto "scongelato" dovrebbe avvenire in banchi o settori separati da quelli nei quali vengono venduti i prodotti freschi; è

inoltre opportuno che il prodotto scongelato sia identificabile attraverso diciture quali ad es. "pesce scongelato, da consumarsi entro le 24 ore e da non ricongelare" (come indicato nella nota del Ministero della Salute 0010026-P-02/08/2007);

- per i prodotti congelati, nelle fasi precedenti la vendita al consumatore finale, va inoltre messa a disposizione la data di produzione e di primo congelamento;
- il termine minimo di conservazione.

Nel caso sia posto in vendita un "miscuglio" il Regolamento (UE) 1379/2013, stabilisce prescrizioni diverse, in particolare per:

- "miscugli di specie diverse", devono essere fornite, per ciascuna specie presente nel miscuglio, la denominazione commerciale, il metodo di produzione e zona di cattura, unitamente al nome scientifico. Quando il metodo di produzione e la zona di cattura sono comuni a tutte le specie presenti nel miscuglio, l'informazione relativa può tuttavia essere fornita in forma comune;
- "miscugli di specie identiche il cui metodo di produzione sia diverso", occorre indicare il metodo di produzione di ogni partita ovvero di ciascuna frazione presente nel miscuglio, ferme restando le altre indicazioni relative al nome commerciale ed alla zona di cattura o di allevamento;
- "miscugli di specie identiche la cui zona di cattura o di allevamento siano diverse", occorre indicare almeno la zona della partita quantitativamente più rappresentativa, aggiungendo l'avvertenza che le altre frazioni presenti nel miscuglio provengano anche esse da zone di cattura diverse (se trattasi di prodotti della pesca) o da Paesi diversi (se trattasi di prodotti di allevamento), senza che occorra specificarle.

Come indicato nell'art. 8 del Regolamento (CE) 2065/2001, e successivamente chiarito nella Circolare 27 Maggio 2002 n° 21329, le informazioni al consumatore devono essere disponibili lungo ogni stadio di commercializzazione.

Per quanto riguarda la denominazione commerciale e scientifica, il metodo di produzione e la zona di cattura, le informazioni sono fornite con l'etichettatura o con l'imballaggio del prodotto oppure mediante un qualsiasi documento commerciale di accompagnamento della merce, compresa la fattura, oppure mediante un documento commerciale che accompagna fisicamente la partita (art. 67 del Regolamento CE 404/2011).

Riguardo alla denominazione commerciale, è stato imposto agli Stati membri, la stesura di una lista di denominazioni commerciali autorizzate (per ciascuna specie, il nome scientifico e la/le denominazione/i in lingua ufficiale), allo scopo di contenere le frodi rese possibili da una nomenclatura incerta, legata a tradizioni locali, che facilitava lo sfruttamento fraudolento in

conseguenza alla somiglianza tra specie di differente pregio. In Italia il MIPAAF ha emanato, a partire dal Decreto MIPAAF del 27 Marzo 2002, una serie di Decreti (l'ultimo dei quali è rappresentato dal Decreto MIPAAF del 12 Agosto 2011) riportanti l'elenco delle denominazioni in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale, suddivise in pesci, molluschi bivalvi, molluschi cefalopodi, molluschi gasteropodi, tunicati e echinodermi. L'aggiornamento pressoché costante di nuove denominazioni commerciali delle specie ittiche è un fenomeno spiegabile sia con l'introduzione di anno in anno di nuove specie sia dal fatto che alcune specie di famiglie importanti dal punto di vista commerciale (come quella delle cernie) hanno cambiato denominazione nei diversi elenchi (Berrini *et al*, 2011). Ai fini del presente Decreto si intende per:

- attestazione di origine: la dicitura "prodotto italiano" o altra indicazione relativa all'origine italiana o alla zona di cattura più precisa di quella obbligatoriamente prevista dalle disposizioni vigenti in materia riportata nelle etichette e in qualsiasi altra informazione fornita per iscritto al consumatore finale;
- prodotto italiano: i prodotti provenienti dall'attività di pesca professionale esercitata da pescherecci battenti bandiera italiana nelle GSAs di cui all'allegato I del presente Decreto.

CAPITOLO 4:

PROBLEMATICHE IGIENICO-SANITARIE E COMMERCIALI DEI PRODOTTI A BASE DI MEDUSA

4.1 Conservazione dei prodotti della pesca

I prodotti della pesca hanno caratteristiche particolari che li rendono più deperibili rispetto ad altri prodotti di origine animale. Essi presentano infatti:

- un elevato tenore di acqua (che rende le carni più aggredibili da parte dei microrganismi e favorisce lo sviluppo delle attività enzimatiche);
- un'elevata presenza di sostanze azotate di natura non proteica (ossido di trimetilammina, creatina, ammoniaca) ed amminoacidi liberi che favoriscono la crescita batterica;
- una ridotta percentuale di glucosio, per cui la carne presenta una scarsa acidificazione dopo la morte che non impedisce la crescita batterica;
- una ridotta percentuale di tessuto connettivo, per cui i batteri riescono a penetrare più facilmente nella profondità delle masse muscolari.

Per tali ragioni, subito dopo la pesca il prodotto ittico va incontro a un rapido processo di deterioramento cui fa seguito un'imponente moltiplicazione microbica, in grado di modificarne le caratteristiche e trasformarlo in un prodotto alimentare non più commestibile (AA.VV. Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria, 2009).

4.2 Idoneità al consumo umano dei prodotti della pesca

Secondo il Regolamento (CE) 854/2004, i prodotti della pesca sono dichiarati non idonei al consumo umano se:

- in seguito a controlli organolettici, fisici, chimici o microbiologici o a controlli relativi alla presenza di parassiti, si rilevano non conformi alla pertinente normativa comunitaria;
- contengono, nelle loro parti commestibili, contaminanti o residui che superano i limiti previsti dalla normativa comunitaria o in quantità tali che l'assorbimento alimentare calcolato sia superiore alla dose giornaliera o settimanale ammissibile per l'uomo;
- derivano da pesci velenosi: prodotti della pesca non conformi ai requisiti in merito alle biotossine, molluschi bivalvi, echinodermi, tunicati e gasteropodi marini che contengono biotossine in quantità che superano i limiti previsti;
- l'autorità competente ritiene che essi possano rappresentare un rischio per la salute

pubblica o degli animali o che, per qualsiasi motivo, non siano idonei al consumo umano.

4.2.1 Contaminazione chimica e residui farmacologici dei prodotti della pesca

(<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/.../BLOB%3AID%3D5164>)

I limiti per il contenuto di alcuni contaminanti chimici (cadmio, mercurio, piombo, arsenico) nei prodotti ittici e le relative modalità di determinazione sono fissati dal Regolamento (CE) 1881/2006. I limiti per il contenuto di IPA (Idrocarburi policiclici aromatici) nei prodotti ittici è invece fissato dal Regolamento (UE) 835/2011. Infine, i livelli massimi di diossine e PCB (Policlorobifenili) nei prodotti ittici sono fissati dal Regolamento (CE) 199/2006.

Le principali fonti d'esposizione al mercurio per la popolazione sono gli alimenti che si contaminano per le attività antropiche (antiparassitari in agricoltura, siti industriali) ma anche per le caratteristiche geologiche dell'area mediterranea ricca di giacimenti naturali di questo elemento, come il complesso del Monte Amiata, in Toscana. Il mercurio presente nell'ambiente acquatico è soggetto a un processo di trasformazione (metilazione batterica) nei sedimenti e così viene assorbito lungo la catena trofica. I pesci presentano i livelli più elevati di mercurio e tra essi i grandi predatori si distinguono per il forte bioaccumulo, che avviene prevalentemente nel muscolo sotto forma di metilmercurio. In generale, elevati livelli d'assunzione di questo contaminante si verificano solo in fasce di popolazione con alti consumi di pesce, specialmente se proveniente da aree contaminate. L'EFSA raccomanda che le donne in gravidanza, le donne in allattamento e i bambini più piccoli orientino i loro consumi di pesce verso un ampio numero di specie, evitando di dare preferenza a specie predatrici a maggior contenuto di metilmercurio (es. squalo, tonno, pesce spada). La valutazione del rischio derivante dal consumo di prodotti ittici è medio-alta.

Il cadmio è un metallo pesante che contamina l'ambiente sia per cause naturali (caratteristiche geochimiche, vulcanismo) sia in conseguenza di processi industriali e agricoli. Nel caso specifico dei prodotti della pesca, la fonte principale di esposizione a cadmio per la popolazione, è rappresentata da alghe marine, crostacei e molluschi bivalvi. Molluschi bivalvi e crostacei rappresentano anche, tra gli organismi acquatici, le principali fonti di esposizione al piombo. Ad ogni modo, secondo l'analisi di valutazione del rischio, l'entità di esposizione a cadmio e piombo derivante dal consumo di questi prodotti è piuttosto bassa.

Gli organismi acquatici, specialmente quelli marini, presentano elevate concentrazioni di arsenico, ma quasi esclusivamente in forme organiche non tossiche, come l'arseno-betaina e gli arsenozuccheri. Anche in questo caso la valutazione del rischio derivante dal consumo di prodotti ittici è bassa.

Gli IPA (Idrocarburi policiclici aromatici) costituiscono una numerosa classe di composti organici tutti caratterizzati strutturalmente dalla presenza di due o più anelli benzenici legati tra loro. Gli IPA possono formarsi attraverso incompleti processi di combustione del carbone, petrolio e dei rifiuti. Nell'aria, nel terreno, nell'acqua e nei cibi non si ritrovano mai come composti singoli, ma all'interno di miscele, dove sono presenti differenti IPA in varie proporzioni. Sono composti altamente lipofili, cioè tendono ad accumularsi nei tessuti grassi. Risulta più facile rinvenire concentrazioni di IPA in pesci che vivono nelle acque interne, quindi più esposti a fonti inquinanti antropiche, e in specie ittiche cosiddette grasse e di taglia medio-grande, come salmoni e anguille.

Un'altra importante fonte di contaminazione è costituita dai processi di trasformazione o di trattamento dei cibi attraverso cotture alla griglia e di affumicatura.

Le diossine sono sostanze che si formano come prodotti indesiderati in modo non intenzionale, dai processi termici di tipo industriale o da processi di combustione da inceneritori.

I PCB (Policlorobifenili) sono composti chimici contenenti cloro, utilizzato in passato nella sintesi di antiparassitari, erbicidi, vernici, solventi e in determinati processi industriali per componenti elettrici. Sono poco biodegradabili, resistenti alle alte temperature, insolubili in acqua. Sono invece liposolubili e quindi tendono ad accumularsi nel grasso degli animali e dell'uomo.

Le diossine e i PCB sono considerate sostanze altamente tossiche avendo mostrato azione neoplastica.

Il consumo di cibi contaminati da diossine e PCB è la fonte principale di accumulo per l'uomo. Alcune fasce della popolazione, quali lattanti e consumatori di diete ad alto contenuto di grassi e residenti in aree altamente contaminate, sono maggiormente esposti a queste sostanze. Tra i prodotti della pesca, quelli pescati in aree di mare contaminate, possono presentare concentrazioni di diossine mentre i pesci di allevamento possono contaminarsi attraverso farine o oli di pesce che sono i costituenti base dei loro mangimi.

Il problema dei residui di farmaci veterinari a livello tissutale, che riguarda essenzialmente i prodotti ittici d'allevamento sottoposti ad interventi profilattici o terapeutici per contrastare lo svilupparsi di determinate ittiopatologie, si può presentare laddove sia stato impiegato in maniera inadeguata (alterazione di dosi e tempi di somministrazione o insufficienti tempi di sospensione) un farmaco autorizzato o quando si è utilizzato illecitamente un farmaco o una sostanza non autorizzata o vietata. Nei Paesi dell'UE l'impiego del farmaco veterinario è regolato da una ricca normativa, evoluta sino ai più recenti Regolamento (CE) 470/2009, Regolamento (CE) 37/2010, D. Lgs 193/2006. L'impianto normativo ha stabilito che solo i

principi attivi autorizzati dall'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) possono essere somministrati agli animali. Per alcuni principi è stato fissato un MRL, cioè un limite massimo di residuo accettabile (privo di rischio per i consumatori) che può essere rinvenuto nei tessuti degli animali trattati. Se i Paesi dell'UE si sono dotati di una buona regolamentazione per l'uso del farmaco veterinario in acquacoltura, a livello internazionale permangono tra i vari Stati diversità normative e di organizzazione nei controlli locali e ciò crea qualche problema sui prodotti di importazione che a volte risultano contaminati da sostanze non autorizzate nella UE.

4.2.2 Contaminazione biologica dei prodotti della pesca

(<https://www.politicheagricole.it/flex/cm/.../BLOB%3AID%3D5164>)

I criteri microbiologici sono stabiliti dal Regolamento (CE) 2073/2005 e successive modifiche. In appendice al Regolamento sono riportate le tabelle dei criteri di sicurezza e di igiene per le varie categorie di prodotti tra cui quelli ittici; esse riportano il microrganismo di riferimento, il piano di campionamento, i limiti, il metodo di analisi, la fase del processo a cui si applica e le misure in caso di risultati non soddisfacenti. Il Regolamento cita quali principali microrganismi presenti nei prodotti della pesca e nei molluschi bivalvi sono potenzialmente causa di patologie nell'uomo: batteri e loro metaboliti e/o tossine (*Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, etc...), parassiti (*Anisakis*, *Diphyllobothrium latum* e *Opisthorchis felineus* etc..) e virus (virus dell'epatite A, Norovirus, etc...)

Inoltre il Regolamento (CE) 2073/2005 fissa i limiti relativi all'istamina, un'ammina endogena derivante dalla decarbossilazione dell'istidina, particolarmente abbondante nelle famiglie di Scombroidei (sgombro, tonno, palamita, etc...) e in misura minore, nei Clupeidi (sardine, acciughe, etc...) che può causare severe intossicazioni con disturbi gastrointestinali, nausea, cefalea, vertigini e reazioni cutanee (AA.VV. Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria, 2009).

Accorgimento fondamentale nella gestione del rischio microbiologico da parte degli operatori del settore alimentare è quello di prestare la massima attenzione alla temperatura di conservazione del pescato e al mantenimento della catena del freddo, al fine di determinare un netto rallentamento della moltiplicazione batterica e sfavorire la produzione di istamina (Regolamento CE 2073/2005).

Il mantenimento della catena del freddo è fondamentale anche nella gestione dei parassiti; eseguire tempestivamente la refrigerazione e la ghiacciatura del prodotto (in seguito all'eviscerazione) ostacola la migrazione delle larve di nematodi nelle carni. Il Regolamento (CE) 853/2004 prescrive il congelamento a una temperatura di almeno – 20°C in ogni parte

della massa per almeno 24 ore dei seguenti prodotti:

- prodotti della pesca destinati ad essere consumati crudi;
- aringhe, sgombri, spratti, salmone (selvatico) dell'Atlantico e del Pacifico, se devono essere sottoposti a un processo di affumicatura a freddo (< 60°C);
- prodotti della pesca marinati e/o salati se il trattamento praticato non garantisce la distruzione delle larve di nematodi.

Per quanto riguarda invece gli agenti virali, misure efficaci volte a contenerne la diffusione dovrebbero concentrarsi sulla prevenzione della contaminazione a tutti i livelli della produzione, anziché sulla eliminazione o inattivazione di questi dagli alimenti contaminati. Attualmente la cottura accurata è l'unica misura efficace per eliminare o inattivare il Norovirus e il virus dell'epatite A dai molluschi bivalvi o da prodotti freschi contaminati.

Gli operatori del settore alimentare devono inoltre garantire che non siano superati i limiti relativi alle biotossine algali, riportate nel Regolamento (CE) 853/2004, per le quali la misura di prevenzione più efficace per impedire di inserire sul mercato prodotti contaminati è quella di monitoraggio delle zone di produzione, effettuato dalle autorità di controllo e dagli stessi produttori. Le biotossine algali sono sostanze organiche con azione tossica prodotte da microrganismi vegetali marini (fitoplancton), i quali si accumulano soprattutto nei molluschi filtratori. Il rischio di intossicazione è pertanto principalmente legato al consumo di molluschi bivalvi (mitili, ostriche, vongole) provenienti da acque caratterizzate da elevate concentrazioni di fitoplancton. Le biotossine algali sono di diverso tipo ed ognuna determina una sintomatologia da intossicazione caratteristica; tra queste, la PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*), l' ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*), DSP (*Diarrethic Shellfish Poisoning*).

Le biotossine sono composti termostabili e pertanto la cottura dei molluschi non riduce il rischio di intossicazione; quindi è importante per evitare tale intossicazione, consumare i molluschi bivalvi di origine certa controllando l'etichetta che deve riportare nome della specie, origine e centro di depurazione e/o spedizione e data di confezionamento.

Infine, secondo il Regolamento (CE) 853/2004, modificato dal Regolamento (CE) 2074/2005, non devono essere immessi sul mercato quei prodotti ottenuti da pesci velenosi appartenenti alle seguenti famiglie: *Tetraodontidae* (pesce palla), *Molidae* (pesce luna), *Diodontidae* (pesce istrice), *Canthicasteridae*.

4.3 Contaminazione ed idoneità al consumo dei prodotti a base di medusa

4.3.1. Contaminazione chimica nei prodotti a base di medusa: presenza di residui di allume

Le tecniche di lavorazione dei prodotti a base di medusa prevedono l'utilizzo di allume (E520: solfato di alluminio; E521: solfato di alluminio e sodio; E522: solfato di alluminio e potassio), perciò quest'ultimo si accumula nei tessuti in concentrazioni elevate: Wong *et al* (2010) e Armani *et al* (2013) analizzando prodotti RE e CP tramite spettroscopia ad assorbimento atomico ne hanno rilevato valori compresi tra 484 mg/kg e 1450 mg/kg. Questa diversità nelle concentrazioni può essere spiegata in considerazione del fatto che, nella preparazione del prodotto, i tempi di esposizione, le temperature e la quantità di allume utilizzata incidono sulla ritenzione di alluminio nei tessuti (Hsieh *et al*, 2001).

L'impiego di additivi alimentari contenenti alluminio è consentito pressoché in tutto il mondo; tali additivi sono utilizzati per le loro proprietà rassodanti, stabilizzatrici e antiagglomeranti. L'alluminio è un metallo duttile, malleabile, non magnetico e non combustibile; in natura, data la sua forte reattività, non lo si trova allo stato puro, bensì nella sua forma ossidata (Al^{3+}) (Giordano *et al*, 1993), la quale si presta bene a formare un'ampia varietà di complessi. In particolare, lo ione Al^{3+} forma i legami più stabili con le altre molecole nei mezzi acquosi. Ciò fa sì che l'alluminio sia uno dei metalli più abbondantemente presenti nella crosta terrestre, dove si trova complessato con silicati, idrossidi, fosfati e sotto forma di criolite (WHO, 1997 <http://www.inchem.org>). I processi naturali come l'erosione del suolo e delle rocce, l'attività vulcanica, le piogge, ma anche l'estrazione dalle miniere per usi industriali, possono causare la ridistribuzione dei composti di alluminio in altri compartimenti ambientali, quali acqua, aria, nonché in animali e vegetali. L'alluminio per le sue proprietà intrinseche, si presta bene a svariati processi di lavorazione, infatti, può essere lavorato a caldo o a freddo, oltre che plasmato in una grande varietà di forme. A livello industriale viene adoperato per il trattamento dell'acqua, la fabbricazione della carta, dei coloranti, dei medicinali e degli additivi alimentari; inoltre, trova impiego sotto forma di leghe nella fabbricazione di utensili da cucina e negli imballaggi per il confezionamento alimentare. Difatti l'alluminio, rappresenta un eccellente materiale per gli imballaggi, poiché garantisce un effetto barriera che protegge il contenuto dalla luce, dall'aria e dall'umidità, garantendo lunghi periodi di conservazione senza far perdere la qualità dei prodotti. Ha inoltre un ottimo rapporto prestazioni-peso, in quanto garantisce una buona resistenza dell'imballaggio con un ridotto peso. Gli imballaggi in alluminio possono inoltre essere riciclati numerose volte (www.CONAI.org). Nel confezionamento dei prodotti alimentari, solitamente l'alluminio non si trova a diretto contatto con l'alimento, dal quale è separato da uno o più strati di materiale

plastico. Un caso di contatto diretto tra alluminio e prodotto alimentare si verifica spesso nel settore della ristorazione, con i cosiddetti "prodotti *take-away*", i quali frequentemente sono confezionati in vaschette per alimenti monouso in alluminio. L'entità della migrazione dell'alluminio dall'imballaggio all'alimento dipende da diversi fattori: durata di esposizione, temperatura, composizione e pH dell'alimento, presenza di altre sostanze quali acidi organici, sali, etc... (EFSA, 2008).

La normativa comunitaria che disciplina l'utilizzo dell'alluminio e delle sue leghe nell'imballaggio dei prodotti alimentari è dettata dal Regolamento (CE) 1935/2004 "*riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari*". Tale Regolamento stabilisce che: "*i materiali e gli oggetti devono essere prodotti conformemente alle buone pratiche di fabbricazione affinché, in condizioni normali o prevedibili di impiego, essi non trasferiscano ai prodotti alimentari componenti in quantità tali da: a) costituire un pericolo per la salute umana; b) comportare una modifica inaccettabile della composizione dei prodotti alimentari; c) comportare un deterioramento delle loro caratteristiche organolettiche*". La norma internazionale EN 601:2004, recepita a livello nazionale con quella UNI EN 601:2004, specifica il massimo valore del contenuto di massa degli elementi di lega e delle impurità di materiali fusi e oggetti destinati al contatto con alimenti, in alluminio e leghe di alluminio.

Alcuni composti dell'alluminio (solfato di alluminio, solfato di sodio e alluminio, solfato di potassio e alluminio, fosfato di sodio e alluminio, etc...) sono autorizzati all'impiego quali additivi alimentari ai sensi della Direttiva 95/2/CE e successive modifiche che ne stabilisce anche le modalità di impiego e le dosi massime consentite.

Quindi, sia che l'alluminio sia già presente negli alimenti per via naturale (frutta, ortaggi, cereali, carni), sia che ne venga in contatto attraverso le lavorazioni industriali o gli imballaggi, sia che ne costituisca parte integrante a seguito del suo impiego quale additivo, la via di esposizione principale per la popolazione è quella alimentare.

La gran parte degli alimenti non trasformati contiene meno di 5 mg/kg di alluminio; concentrazioni più elevate sono state riscontrate nel pane, nei dolci da forno, nei prodotti di pasticceria, nella frutta glassata, in alcune verdure, in prodotti caseari, nelle salsicce, nei molluschi, etc... (EFSA, 2008). Vi sono, comunque, ampie variazioni nell'ambito dei diversi alimenti e, soprattutto dei diversi Paesi di produzione; quest'ultima considerazione è legata al fatto che al di fuori della Comunità, i livelli medi tollerati di alluminio sono differenti nelle varie normative nazionali, così come è differente il tipo di utilizzo che viene fatto di questo metallo in ambito alimentare (imballaggi, additivi, etc...).

Dopo l'assorbimento, l'alluminio si distribuisce in tutti i tessuti degli animali e dell'uomo,

trasportato nel plasma dalla transferrina. Tende ad accumularsi, soprattutto nelle ossa (dove è in grado di persistere a lungo prima di essere escreto con l'urina); altre sedi di accumulo sono a livello cerebrale, fetale e placentare (EFSA, 2008). Esposizioni prolungate e ripetute possono esitare in patologie a carico del sistema nervoso con deficit di apprendimento (in particolare nei bambini), incoordinazione motoria, confusione mentale, cefalee, problemi digestivi, anemia (per interferenza con il metabolismo del ferro), emolisi, carie dentaria (l'alluminio compete con il fluoro impedendone l'assorbimento), ipoparatiroidismo, osteomalacia, etc... (www.sanitalia.it).

Anche se, attualmente, il Regolamento (CE) 1881/2006, che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti, compresi i metalli pesanti, presenti nelle derrate alimentari non prende in considerazione l'alluminio, secondo il parere dell'EFSA deve essere prevista una dose settimanale tollerabile (TWI), corrispondente a 1 mg di alluminio per kg di peso corporeo (EFSA, 2008). In virtù del rischio sanitario associato al consumo di alluminio, nei prodotti a base di medusa è stato fissato un limite di 1,2-2,2 %.

Un'altra problematica è legata ai contenitori di questi prodotti, spesso privi del necessario marchio identificativo per l'utilizzo alimentare. Considerando il crescente numero di allerte per cessione di sostanze chimiche di materiali destinati al contatto con alimenti provenienti dai Paesi asiatici, questo aspetto deve essere attentamente valutato (Armani *et al*, 2011).

4.3.2 Rischi microbiologici nei prodotti a base di medusa

Analisi effettuate sui campioni di medusa hanno evidenziato nel complesso una condizione igienico-sanitaria discreta per ciò che concerne i criteri microbiologici di sicurezza previsti dai Regolamenti (CE) 2073/2005 e 1441/2007 in quanto sono risultati assenti sia *Salmonella* spp., sia *Listeria monocytogenes* (come era auspicabile e prevedibile in prodotti in salamoia o salati e commercializzati sotto vuoto come i "Ready to eat"); anche la carica aerobia mesofila, coliformi totali, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., bacilli totali, clostridi solfito riduttori, specie fungine, chemioantibiotici e sostanze inibenti ad attività antibatterica si sono dimostrati assenti o presenti in quantità modeste. In particolare, in un lavoro di Castigliero *et al* (2009) su un totale di 10 campioni, due hanno mostrato la presenza di una carica mesofila aerobia più alta, dovuta probabilmente ad una più elevata contaminazione delle materie prime. Inoltre, vista la tipologia di prodotti (ittici) e la loro modalità di confezionamento (salati sotto vuoto o in salamoia) è possibile giustificare l'assenza di specie fungine sui campioni presi in esame nel sopra detto studio.

4.4 Il problema della tracciabilità dei prodotti alimentari a base di medusa

Da un punto di vista puramente normativo, sebbene ormai commercializzati da diversi anni, questi prodotti continuano a presentare molteplici non conformità ai requisiti stabiliti nella normativa comunitaria sull'etichettatura (Reg. CE 2065/2001 e la successiva emanazione del Reg. UE 1379/2013). In particolare, in etichetta l'errata traduzione, volontaria o involontaria, della denominazione commerciale che fa riferimento a prodotti di natura vegetale, come “tubero di senape”, “bamboo” o “fiori di giglio”, con i quali potrebbero essere confusi i prodotti a base di medusa per la loro somiglianza morfologica, li sottrarrebbe alle disposizioni legislative vigenti in materia di origine animale (Armani *et al*, 2011).

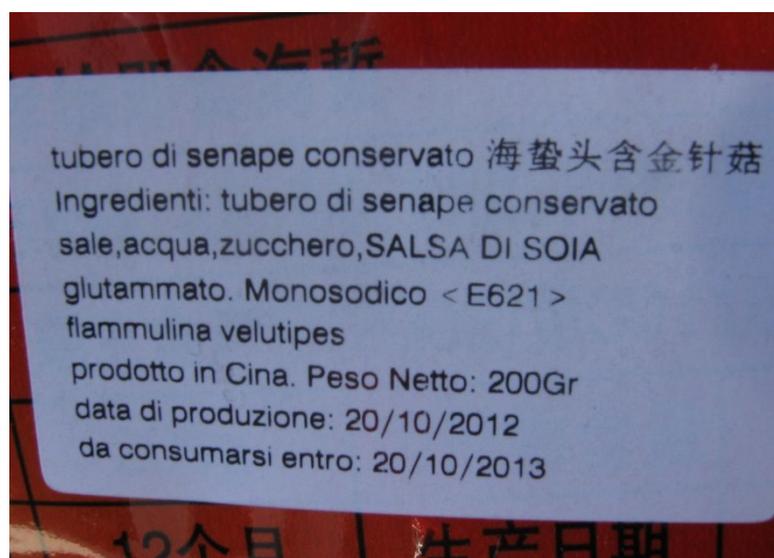


Fig. 5.1: etichetta con errata traduzione della denominazione commerciale (Fonte: FisLab)

A complicare il quadro, il fatto che anche la commercializzazione di questi prodotti presenta delle vere e proprie lacune da un punto di vista normativo: le meduse, essendo invertebrati marini, si ritrovano nell'ambito della Nomenclatura Combinata (Codice NC) presente nella Sezione I, Capitolo 3 – Pesci e crostacei, molluschi e altri invertebrati, della Tariffa Doganale d'Uso Integrata (TARIC): con il codice 0307 vengono presi in considerazione “*molluschi, anche separati dalla loro conchiglia, vivi, ..., invertebrati acquatici diversi dai crostacei e dai molluschi, vivi, refrigerati, congelati, ..., atti all'alimentazione umana*”. Tale codice compare, infatti, sul Documento Veterinario di Entrata (DVCM) che accompagna questi prodotti importati nel nostro Paese (Castigliengo *et al*, 2009). Il Phylum Cnidaria, pur appartenendo a pieno titolo ai prodotti della pesca così come definiti dalla “Pacchetto igiene”: “*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 e rane), selvatici o di*

allevamento, e tutte le forme, parti e prodotti commestibili di tali animali”, non rientra in maniera definitiva neanche nella più recente integrazione relativa alle denominazioni commerciali emanata nel Decreto MIPAAF 2010, dove fra gli invertebrati acquatici si ritrovano soltanto i molluschi, crostacei, echinodermi e tunicati. Attualmente, in Italia, il MIPAAF, ha adottato la denominazione commerciale provvisoria “medusa asiatica” che si riferisce alla sola specie *Rhopilema esculentum*. Tuttavia, in un precedente studio (Armani *et al*, 2013) è stato evidenziato come la gran parte dei prodotti alimentari a base di medusa venduti in Italia presentino dei *mislabeleding* (errori di etichettatura), riportando in etichetta la denominazione scientifica “*Rhopilema esculentum*” mentre in realtà risultano costituite da altre specie di minor pregio quali soprattutto *Nemopilema nomurai*, ma anche *Pelagia noctiluca* e *Rhizostoma pulmo*. Per tale motivo, per questi prodotti appare necessaria la revisione delle denominazioni commerciali. Inoltre sarebbe opportuno includere tra le tecniche a disposizione per i controlli ufficiali, come specificato dal Regolamento CE 1379/2013, anche le analisi biomolecolari sul DNA. In particolare, a livello europeo sarebbe utile considerare l’utilizzo di queste nuove metodiche in punti strategici di arrivo delle merci da Paesi terzi (Posti di Ispezione Frontaliera, detti PIF) come ausilio per la corretta identificazione di specie di prodotti della pesca (soprattutto nel caso di nuove specie o di prodotti lavorati o trasformati, in cui le chiavi dicotomiche per il riconoscimento di specie non possono essere impiegate) (Armani *et al*, 2013). Analizzate tutte le criticità relative al “prodotto alimentare medusa” e considerate le sue potenzialità commerciali nei mercati occidentali e la rapida crescita delle comunità che ne fanno uso abituale, si rende necessaria un’indagine più accurata sia per evidenziarne eventuali problematiche di natura igienico-sanitaria che per verificarne la natura e l’origine in modo da poterne legalizzare a pieno titolo la commercializzazione inserendolo, a titolo definitivo, nell’elenco dei prodotti ittici nazionali (Armani *et al*, 2011).

CAPITOLO 5:

LE FRODI NEL SETTORE ITTICO

5.1. Le Frodi alimentari: origini ed evoluzione

In senso generico, con il termine frode alimentare s'indica la produzione, detenzione, vendita o somministrazione di alimenti non conformi alle leggi vigenti.

Questo tipo di attività illegale ha origini molto antiche, in quanto databile in concomitanza con i primi scambi commerciali della storia. Nell'antico Egitto, ad esempio, era prevista la condanna a morte per chi ripetutamente poneva in essere truffe in ambito alimentare (Nebbia, 1962).

Le prime misure in materia di prevenzione dei reati alimentari si registrano nell'antica Grecia, in cui è nota la presenza di vigili sanitari, con il compito di controllare il commercio. In particolare, alcuni di loro erano specializzati nello scoprire le frodi sul vino, tra le più comuni all'epoca (Nebbia, 1962).

In Europa il fenomeno delle frodi assume dimensioni rilevanti nell'1800, quando viene dettagliatamente denunciato da un chimico dell'epoca (Accum, 1820). Il libro ha una grande risonanza per il periodo e scuote gli animi rivelando l'entità e la larga diffusione di alterazioni e sofisticazioni alimentari, favorite anche dall'industrializzazione e dal conseguente sviluppo delle tecnologie di trasformazione alimentare (Wilson, 2008).

Le frodi aumentarono ulteriormente nel corso delle due Guerre Mondiali a causa della scarsità di cibo, che stimolava l'uso di materie prime scadenti o addirittura l'aggiunta di materie non alimentari (ad es. produzione di pane con farine scadenti o con l'aggiunta di polvere di gesso). Negli anni '80 si susseguirono diversi scandali, tra cui uno dei più famosi, scoppiato nel 1986, riguarda l'aggiunta di metanolo al vino per alzare la gradazione alcolica, che causò 23 decessi e numerose intossicazioni con danni gravissimi (cecità e danni neurologici). A questo seguì la scoperta di un diffuso uso fraudolento di anabolizzanti (sostanze che favorendo la sintesi delle proteine inducono un aumento delle masse muscolari), nel settore della produzione delle carni (www.scienzattiva.eu “Le frodi negli alimenti di origine animale”, Guardone, 2015).

Recentemente, uno dei più gravi scandali mondiali ha interessato il latte in polvere per bambini (ma anche latte fresco, gelati e yogurt) addizionato con melamina, una sostanza chimica utilizzata per produrre materie plastiche che in quanto ricca di azoto veniva aggiunta per mantenere artificialmente alto il contenuto proteico nel latte annacquato. La sostanza, fortemente tossica, provoca soprattutto danni renali. Nel 2008, l'anno dello scandalo, ha

causato danni in 53000 bambini cinesi e 6 decessi. La melamina è stata trovata poi anche in numerosi altri prodotti alimentari (www.scienzattiva.eu “Le frodi negli alimenti di origine animale”, Guardone, 2015).

Nel 2013 ha destato molto clamore la scoperta della presenza di carne di cavallo in prodotti a base di macinato di manzo. A seguito delle prime segnalazioni in Gran Bretagna e Irlanda, le analisi hanno poi messo in luce un fenomeno molto diffuso e lo scandalo ha coinvolto più di 20 Paesi. Oltre alla frode commerciale (scambio di carne di cavallo con bovino), l'aspetto più preoccupante riguardava l'ipotesi dell'impiego di carne di cavallo proveniente da animali sportivi e da corsa, avvalorata dal ritrovamento di tracce di un antinfiammatorio (fenilbutazone) molto usato in questo tipo di animali (<http://www.ilfattoalimentare.it/tortellini-buitoni-carne-cavallo-nestle-italia.html>).

In sintesi, le frodi alimentari seguono l'evoluzione dei tempi sfruttando le diverse tecnologie disponibili. Infatti, oggi le autorità sanitarie si trovano a fronteggiare tipi di frodi un tempo impensabili (es. aggiunta di coloranti sintetici al peperoncino per rendere più brillante il colore). In un certo senso è talvolta il consumatore stesso, involontariamente, a stimolare alcune frodi esigendo o preferendo condizioni non naturali: ad es. i tranci di tonno fresco sono trattati con monossido di carbonio per ottenere una colorazione rosso viva ed evitare quella rosso cupa, naturale ma meno apprezzata. In questo senso, l'educazione del consumatore riveste enorme importanza per combattere le frodi (Colavita *et al*, 2012).

I fattori favorenti sono numerosi e variano a seconda del settore, ma i più importanti per quanto riguarda gli alimenti di origine animale sono:

- l'aumento del consumo di prodotti di origine animale con conseguente forte richiesta da parte del mercato. Alla fine dell'800 in Italia pesce e carne erano pressoché inesistenti nella dieta della popolazione, che si basava principalmente su alimenti come pane, legumi e zuppe. Dopo la seconda Guerra Mondiale, a seguito anche dello sviluppo delle tecniche di allevamento intensivo, prodotti alimentari di pregio come la carne, il latte, i formaggi diventarono molto più accessibili e, nel contesto di un aumento generalizzato dei consumi, anche quelli dei prodotti di origine animale aumentarono notevolmente (Capatti *et al*, 1998).
- la globalizzazione del mercato: la globalizzazione richiede filiere diversificate e più lunghe, anche al fine di rispondere alla domanda della crescente popolazione urbana. Lo sviluppo di un mercato globale ha favorito le attività criminali legate alle frodi, poiché spesso tali filiere sono caratterizzate da fornitori lontani e anonimi, e ha esteso su un maggior numero di consumatori l'impatto di queste attività criminali (Spink & Moyer, 2011).

- l'evoluzione delle conoscenze scientifiche e tecnologiche che hanno consentito la creazione di nuove tecniche produttive e conservative, hanno allo stesso tempo consentito la messa a punto di nuove tecniche per rallentare, inibire o mascherare eventuali condizioni indesiderate dell'alimento o per conferire allo stesso caratteristiche che in realtà non possiede (Colavita *et al*, 2012).

5.1.1 Classificazione delle frodi alimentari (Colavita *et al*, 2012)

Un'importante distinzione delle frodi è la suddivisione tra:

- frode sanitaria o tossica: rende dannoso un alimento e rappresenta un pericolo per la salute del consumatore. Secondo il C.P. i casi di avvelenamento, adulterazione, contraffazione di sostanze alimentari costituiscono reato e sono compresi tra i “delitti contro l'incolumità pubblica” (art.439, 440, 442 e 444 del C.P.). Costituisce reato anche il solo fatto di mettere in commercio sostanze pericolose, anche se non sono state ancora vendute, così come la distribuzione gratuita di alimenti nocivi.
- frode commerciale: danneggia gli interessi economici del consumatore ma non la sua salute. L'alterazione della qualità dell'alimento, infatti, non è tale da renderlo nocivo, ma si consegna all'acquirente una cosa per un'altra (*aliud pro alio*), oppure gli vengono fornite false dichiarazioni circa la quantità, la qualità, l'origine o la provenienza dell'alimento, creando un illecito profitto a danno del consumatore. Si verifica quando “*chiunque, nell'esercizio di un'attività commerciale, ovvero in uno spaccio aperto al pubblico, consegna all'acquirente una cosa mobile per un'altra, ovvero una cosa mobile, per origine, provenienza, qualità o quantità, diversa da quella dichiarata o pattuita...*” (art. 515 del C.P.).

Inoltre, le frodi alimentari possono essere classificate, secondo gli effetti esercitati sulla composizione e/o aspetti esteriori dell'alimento, in frodi sulla qualità intrinseca del prodotto e frodi riguardanti la commercializzazione degli alimenti.

Frodi sulla qualità intrinseca del prodotto:

- Alterazioni: solitamente accidentali e dovute a fenomeni degenerativi spontanei che portano a modifiche della composizione originaria e delle caratteristiche organolettiche di un prodotto alimentare, con depauperamento o ripercussioni negative anche sulle caratteristiche nutrizionali. Sovente dovute a cattiva conservazione degli alimenti, quali errate modalità o eccessivo prolungamento dei tempi di conservazione. Diventa frode quando viene provato che il peggioramento delle caratteristiche del prodotto sono dovute a cattiva conservazione dello stesso per incuria.
- Adulterazioni: modifiche della naturale composizione di un prodotto alimentare, tramite sostituzione di elementi propri dell'alimento con altri estranei, oppure con la sottrazione di elementi propri dell'alimento, o ancora, con l'aumento della quantità

proporzionale di uno o più dei suoi componenti (es. aggiunta di polifosfati in pesci di alto valore commerciale come la sogliola allo scopo di incrementare il peso del prodotto, latte scremato venduto come latte intero, olio di semi venduto per olio d'oliva, vino annacquato).

➤ Sofisticazioni: consistono nell'aggiungere all'alimento sostanze estranee o nel sostituire totalmente o parzialmente uno o più elementi propri dell'alimento (con sostanze di qualità e valore inferiore oppure mediante l'uso di sostanze chimiche addittivate non consentite dalla legge), alterandone quindi la composizione, con l'obiettivo di migliorare l'aspetto del prodotto o occultarne difetti (es. aggiunta di saccarosio al vino, salsiccia fresca trattata con additivo a base di anidride solforosa per renderla di colore rosso, trattamento della mozzarella con perossido di benzoile per “sbiancarla”, aggiunta di coloranti nelle paste normali per simulare la pasta all'uovo, trattamento con perossido d'idrogeno per “sbiancare” il pesce dopo lo scongelamento e conferirgli in tal modo l'aspetto lucente e brillante tipico del prodotto fresco).

Frodi riguardanti la commercializzazione degli alimenti:

➤ Falsificazioni: commercializzazione di un prodotto al posto di quello dichiarato, definito anche come *aliud pro alio* (es. vendita di specie ittiche meno pregiate al posto di specie di maggior pregio, come descritto in diversi studi di Armani *et al*, 2012b, del bianchetto sostituito con il pesce ghiaccio).

➤ Contraffazioni: finalizzate a conferire al prodotto alimentare un'identità diversa da quella propria o a creare un prodotto *ex novo* apparentemente e ingannevolmente uguale a quello reale ma prodotto con sostanze diverse, per qualità o quantità, da quelle che normalmente concorrono a formarlo (es. margarina venduta come burro, margarina prodotta con idrocarburi minerali; uso improprio di nomi e marchi molto noti o falsificazione di marchi; dallo studio di Armani *et al*, 2012c, la vendita di rana pescatrice nostrana, *L. piscatorius*, con una di diversa origine). Molto frequente tra le contraffazioni è l'uso improprio del marchio “*Made in Italy*”, che alimenta un *business* globale da 60 miliardi di euro di cibi venduti come italiani ma originari di altri Paesi, per larga parte in mano alla criminalità organizzata (Monti & Ponzi, 2013).

In Italia i casi più frequenti di frodi alimentari a danno del consumatore si realizzano attraverso false dichiarazioni in merito alla provenienza, alla qualità, alla composizione e alle caratteristiche di un prodotto alimentare. Nel primo semestre del 2000, su 4802 aziende alimentari e ristoranti controllati dall'Ispettorato Centrale Repressione frodi del MIPAF, in circa il 12 % sono state rilevate anomalie. Le frodi sono in netto aumento (+ 32 % nell'anno 2008-2009). Molto colpiti sono i settori dei prodotti tipici e dei prodotti biologici. Per quanto riguarda le importazioni, nel 2007 Cina e Turchia sono risultati i Paesi da cui maggiormente

provengono prodotti irregolari (Colavita *et al*, 2012).

5.2 Le frodi nel comparto ittico

Il settore ittico figura tra i settori commerciali maggiormente soggetti a frodi di sostituzione di specie, poiché contraddistinto da un numero di specie potenzialmente commerciabili e da una diversificazione dell'offerta dei prodotti molto vasti (Armani *et al*, 2012d; Busato, 2010).

Le frodi nel settore ittico, infatti, prevedono molto frequentemente la fornitura al consumatore di qualcosa di diverso dal prodotto atteso, come specie o tipologie di prodotti meno desiderabili, più economici o più facilmente disponibili. Oltre alle dichiarazioni false in etichetta, tali frodi si avvalgono spesso di falsificazioni documentali, potenzialmente in ogni fase della catena produttiva (Stiles *et al*, 2011). Tra le più frequenti ricordiamo:

- prodotti decongelati venduti come freschi;
- prodotti di allevamento venduti come prodotti selvatici catturati in mare;
- vendita di specie ittiche diverse da quelle dichiarate;
- prodotti trattati con additivi non consentiti, spesso per mascherare alterazioni (ad es. ravvivamento del colore delle branchie mediante un trattamento con anilina e ammoniaca) (Colavita *et al*, 2012).

Lo sviluppo di nuove tecniche di lavorazione, confezionamento, conservazione e trasporto, associato alla globalizzazione dei mercati, ha potenziato il commercio mondiale di pesce, rendendo più facile e frequente l'importazione dall'estero (Mansfield, 2003; Hajipieris, 2009). L'Italia, ad esempio, importa più del 50 % del pesce consumato a livello nazionale. Di conseguenza, il numero delle specie commercializzate è aumentato significativamente in molti Paesi: ad oggi più di 1800 specie ittiche diverse provenienti da tutto il mondo sono disponibili negli USA (Armani *et al*, 2012d; FDA, 2014), mentre in Italia il numero è salito da 200 a più di 900.

La commercializzazione di nuovi prodotti provenienti da tutte le parti del mondo, comporta che il percorso seguito da un prodotto ittico “dall'acqua al piatto” sia sempre più intricato. L'importazione di prodotti da Paesi molto lontani comporta la presenza in media di 5-7 intermediari nella catena produttiva, rendendo così più difficile effettuare i controlli sulla qualità dei prodotti e sulla tracciabilità lungo tutta la filiera. Di conseguenza le informazioni sul prodotto possono essere perse (Jacquet & Pauly, 2007) e le frodi, volontarie e non, sono favorite e in aumento (Stiles *et al*, 2013, Armani *et al*, 2012d).

Un altro dei fattori che contribuisce alla larga diffusione delle frodi è legato al fatto che la maggior parte dei pesci vengono lavorati prima di essere importati nei Paesi in cui saranno venduti; il pesce non lavorato rappresenta ormai solo una piccola frazione del pesce importato

in Europa e in USA (Rasmussen, 2009). Infatti, i consumatori occidentali preferiscono acquistare prodotti trasformati, puliti, che spesso sono venduti già pronti da cuocere o da consumare (“*Ready to cook*” e “*Ready to eat*”). A questi prodotti, nel corso della lavorazione, vengono rimosse alcune caratteristiche distintive, come la pelle, la testa e le pinne. Per questo motivo l'identificazione morfologica della specie diventa particolarmente difficile, se non impossibile (Armani *et al*, 2012d).

In questo scenario, la possibilità di sostituire delle specie di un certo valore con specie di valore inferiore diventa una pratica molto conveniente. Altri moventi comuni dietro le frodi sono la sostituzione di specie fortemente richieste dai consumatori con altre specie, locali o importate, durante i periodi di indisponibilità stagionale delle prime (Jacquet & Pauly, 2008). Talvolta, una frode commerciale per sostituzione di specie può avere risvolti anche sulla salute pubblica; infatti, le sostituzioni illecite possono determinare il consumo di specie pericolose come il pesce palla (Famiglia *Tetraodontidae*), la cui vendita è vietata in Europa ai sensi del Reg. CE 853/2004, ma che a volte sono venduti al posto di code di rana pescatrice (*Lophius spp.* Famiglia *Lophiidae*) (<http://www.eurofishmarket.it/files/EFMpescapallatepferri.pdf>).

Un altro caso riguarda alcune specie etichettate come “merluzzo” (*Gadus spp.*), tonno (*Thunnus spp.*), “pesce spada” (*Xiphias gladius*) e “*White steenbras*” (*Lithognathus lithognathus*) ma sostituite con il ruvetto (*Ruvettus pretiosus*), una specie tossica della famiglia *Gempylidae*, la cui commercializzazione è sottoposta a particolare regolamentazione in Europa e in alcuni Paesi asiatici (Ling *et al*, 2009).

In altri casi si possono verificare problematiche sanitarie nel caso di sostituzioni con specie che contengono molto mercurio. Anche se quasi tutti i pesci e crostacei contengono tracce di mercurio, alcune specie ittiche (come il tonno e il pesce spada), in funzione anche della taglia e della provenienza geografica, accumulano concentrazioni più elevate, che possono essere particolarmente dannose in soggetti sensibili come le donne incinte e bambini (FDA & EPA, 2004).

Tra le problematiche sanitarie va considerato anche il fatto che il numero crescente di specie disponibili sul mercato e la crescente domanda di pesce, può esporre i consumatori a nuovi rischi per la salute, in precedenza limitati a specifiche aree geografiche. Ad es. l'intossicazione da ciguatera, dovuta al consumo di pesci della barriera corallina che veicolano la tossina responsabile dell'intossicazione. Mentre un tempo questa problematica si verificava soprattutto nelle regioni tropicali, è ora segnalata anche in altre regioni, a causa dell'importazione di questi pesci (Lehane & Lewis, 2000).

Inoltre, le frodi ingannano i consumatori creando una percezione distorta del vero stato di

conservazione dell'ambiente acquatico, mantenendo l'illusione di una continua disponibilità di specie ittiche molto richieste (Miller & Mariani, 2010; Marko *et al*, 2004). È il caso, ad esempio, del merluzzo bianco, la cui continua richiesta da parte del mercato, nonostante il forte declino delle popolazioni selvatiche, crea forti incentivi per la sua sostituzione con specie più comuni, ma meno costose come il pollock (Miller & Mariani, 2010), creando nel consumatore l'illusione di un'abbondanza di merluzzo.

La diffusione delle frodi per sostituzione di specie si attesta frequentemente intorno a un terzo del pesce esaminato (Jacquet & Pauly, 2008). Numerosi studi che hanno utilizzato tecniche basate sull'analisi del DNA hanno confermato che le frodi sono estremamente diffuse, raggiungendo valori del 25-80 % per specie come dentice, salmone selvatico e merluzzo (Miller & Mariani, 2010; Logan *et al*, 2008; Jacquet & Pauly, 2008). Recentemente, alcuni studiosi hanno riportato che una notevole quantità di specie di scarso valore veniva venduta sotto il nome di “Red Snapper” (*Lutjanus campechanus*), una delle specie più sostituite al mondo (Stiles *et al*, 2011; Cawthorn *et al*, 2012).

Si sono verificati anche casi in cui il merluzzo del sud del Pacifico, pesce di mare pelagico, è stato venduto come tilapia, pesce allevato d'acqua dolce e meno pregiato (Martinez-Ortiz, 2005).

Anche i molluschi bivalvi sono spesso soggetti a frodi, ad esempio, alcune specie sono fraudolentemente vendute con il nome di vongola verace (Mafra, 2008).

In Italia, a causa della forte richiesta, le forme giovanili di *Sardinia pilchardus* (“bianchetto”) e *Aphia minuta* (“rossetto”), sono molto care (20-40 euro/Kg) e sono spesso oggetto di frodi. Possono essere facilmente sostituite con il meno prezioso pesce ghiaccio cinese, uno dei pesci più comunemente esportati in Europa (Armani *et al*, 2012b).

CAPITOLO 6:

APPROCCIO ANALITICO PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE NEI PRODOTTI ITTICI

Secondo il rapporto FAO del 2014, negli ultimi anni la richiesta di prodotti della pesca è notevolmente aumentata, con un tasso medio annuo del 3,2 % negli ultimi cinquanta anni.

L'enorme sviluppo di questo settore è dovuto a diversi fattori, fra cui l'aumento della popolazione mondiale, dei redditi e dell'urbanizzazione, che facilitano l'apertura dei canali di distribuzione più efficienti e una forte espansione nella produzione del settore ittico. La Cina è il principale responsabile dell'incremento della produzione, in quanto ha drasticamente aumentato le proprie attività di pesca ed, in particolare, di acquacoltura. Attualmente, i prodotti del settore ittico ammontano a circa 158 milioni di tonnellate, delle quali 91,4 sono riferite al pescato in mare e 66,6 ai prodotti di acquacoltura. Nel 2011, in particolare, la quantità mondiale di pescato ha avuto un picco di 93,7 milioni di tonnellate, superata solo dal picco di 93,8 milioni di tonnellate raggiunta nel 1996 (FAO, 2014).

Sul mercato comunitario è dunque inevitabilmente presente una grande quantità di pesci, crostacei e molluschi (provenienti non solo dalle acque mediterranee ed europee, ma da ogni parte del mondo), prodotti sui quali si devono effettuare i necessari controlli a tutela del consumatore (Campagna *et al*, 2008). A tal proposito, gli ispettori sanitari (veterinari ufficiali, NAS, ufficiali della capitaneria di porto, etc...) sempre più spesso si trovano in difficoltà nel riconoscimento di specie (Armani *et al*, 2012d). Questa difficoltà non è dovuta soltanto alla crescente offerta di nuove specie ittiche sul mercato, ma anche alla sempre maggiore presenza di nuove tipologie di prodotti diverse dal prodotto intero, quali filetti, tranci, spiedini, bastoncini (http://www.ismea.it/flex/files/2/e/e/D.a8b3276d6861bddaf50f/RC_ittico_2011.pdf).

Questa vasta diversificazione dell'offerta espone il mercato ittico, più facilmente rispetto agli altri comparti produttivi, a frodi commerciali per sostituzione di specie. In Italia, la metodica tradizionale per il riconoscimento di specie ittiche è basata sull'identificazione morfologica delle caratteristiche anatomiche macroscopiche del prodotto intero, secondo chiavi dicotomiche proposte dalla FAO (Cutarelli *et al*, 2014); A causa delle problematiche trattate sopra, quest'ultima non è tuttavia più sufficiente a garantire in maniera ottimale la tutela del consumatore e si rivela pertanto indispensabile ricorrere a specifiche tecniche di laboratorio. Ad oggi non esiste tuttavia alcun sistema analitico ufficiale per l'identificazione di specie di prodotti della pesca a livello Comunitario (Campagna *et al*, 2008).

Recentemente l'*European Commission Joint Research Centre* (JRC) ha pubblicato un

report intitolato “*Deterring Illegal Activities in the Fisheries Sector*” (Martinsohn, 2011), che illustra le attuali metodiche chimiche, biomolecolari e forensi in grado di garantire la tracciabilità dei prodotti ittici ed ha previsto che, grazie alle innovazioni che caratterizzano questo settore ed alla riduzione dei costi, le metodiche basate sull’analisi del DNA hanno le potenzialità per diventare i sistemi di controllo ufficiali impiegati a livello delle agenzie europee di controllo.

6.1 Cenni sulle metodiche analitiche per l’identificazione di specie ittiche

6.1.1 Analisi degli acidi grassi

Tra le tecniche di laboratorio utilizzate fino ad oggi ci sono quelle che si basano sull’analisi degli acidi grassi. Negli organismi marini ne sono presenti circa 20 ma la loro concentrazione ed il rapporto è molto variabile e va a costituire il cosiddetto “profilo lipidico”, il quale è in parte determinato dalla genetica dell’individuo ed in parte dalle caratteristiche ambientali in cui il soggetto si è sviluppato, come la temperatura dell’acqua, la salinità, ma anche dalla dieta (Kwetegyeka *et al*, 2008) Per questo motivo esiste una certa variabilità all’interno della stessa specie in funzione della localizzazione geografica della popolazione considerata. Di conseguenza, tale tecnica analitica è applicabile quasi esclusivamente laddove i prodotti provengano dalla stessa area geografica in maniera tale che l’ambiente non abbia potuto incidere sul loro profilo lipidico. Gli studi del profilo lipidico si rendono utili per verificare, ad esempio, la zona di provenienza dei prodotti ittici sia catturati che allevati in accordo con la nuova regolamentazione riguardante l’etichettatura (Reg. CE 1169/2011 e Reg. CE 1379/2013), che prevede siano fornite informazioni sull’origine geografica e il metodo di produzione del prodotto. Questo metodo è stato impiegato con successo in uno studio di Morrison *et al*. (2007) per stabilire la provenienza e il metodo di produzione dell’orata.

6.1.2 Analisi delle proteine

I primi studi miravano ad identificare le differenze tra individui attraverso l’analisi dei polimorfismi aminoacidici in quanto risultato dell’espressione diretta dei geni, e quindi caratteristici della specie. Tutti i metodi che si basano sull’identificazione di specie attraverso lo studio della sequenza proteica (o di quella nucleotidica) si basano sul presupposto che esemplari della stessa specie possiedono sequenze che sono specifiche per quella specie e che sono diverse da quelle presenti in individui di specie diverse (Pereira *et al*, 2008). Per l’identificazione di specie risulta essenziale la scelta della sequenza proteica da analizzare in quanto si deve tener presente che ci possono essere delle divergenze anche all’interno della stessa specie dovute a processi di mutazione e ricombinazione. Difatti loci diversi hanno diversi tassi di evoluzione per cui risulta che alcune sequenze proteiche sono più conservate di altre (Pereira *et al*, 2008).

Tra le tecniche maggiormente usate basate sullo studio delle proteine ci sono quelle elettroforetiche. L'elettroforesi, in senso lato, è un termine che si riferisce alla separazione di molecole elettricamente cariche quando sottoposte ad un campo elettrico. Questo principio si applica ad un elevato numero di metodiche che sono state utilizzate per separare non solo proteine, ma anche piccole molecole e acidi nucleici (Armani *et al*, 2012d). Nel campo dell'analisi degli alimenti vengono utilizzate numerose varianti di questa tecnica: l'*SDS-Page*, l'elettroforesi bidimensionale, l'elettroforesi capillare (CE), e l'isoelettrofocalizzazione (IEF). L'IEF delle proteine sarcoplasmatiche, in particolare, è una procedura elettroforetica molto diffusa e ufficialmente utilizzata in molti Paesi per scopi identificativi di specie su differenti matrici alimentari (Martinson, 2011). Nel 1995 è stata ufficializzata negli USA dalla *Food & Drug Administration* (FDA) come metodo d'identificazione delle specie ittiche. L'IEF permette di separare le proteine sarcoplasmatiche idrosolubili, in funzione del loro punto isoelettrico (pI), valore di pH al quale la carica complessiva della proteina è nulla. Una proteina dispersa in un gradiente di pH si troverà ad avere carica netta positiva o negativa nel caso in cui si trovi, rispettivamente, al di sotto o al di sopra del suo punto isoelettrico. Sottoposta all'azione di un campo elettrico opportunamente orientato essa si muoverà, a seconda della propria carica, verso l'elettrodo di segno opposto, fino a raggiungere il pH pari al suo pI. In questo punto essa assume carica netta nulla e si ferma. Qualsiasi spostamento in direzione del campo elettrico implicherebbe l'assunzione di carica, dovuta alla variazione di pH, determinando il movimento in verso opposto della proteina, che trovandosi nuovamente al suo pI perderebbe la carica acquisita fermandosi. Come risultato, proteine diverse, e quindi con cariche diverse, si concentrano in zone differenti sotto forma di bande. Per questo motivo si parla di "focalizzazione", con risoluzione tanto più elevata quanto più netto risulta il gradiente di pH nel gel. In questo modo è possibile ottenere, per le proteine estratte, una vera e propria mappa tipica della specie (Martinson, 2011). Numerosi sono i lavori che mirano a creare un *fingerprint* per diverse specie utilizzando la tecnica della focalizzazione isoelettrica (Berrini *et al*, 2006).

L'IEF è stata ad esempio messa a punto per l'identificazione delle differenti specie di Pesce palla (famiglia *Tetraodontidae*), ed utilizzata per analizzare prodotti a base di pesce venduti sul mercato di Taiwan (Chen *et al*, 2003).

Tuttavia, la tecnica dell'isoelettrofocalizzazione presenta anche alcuni svantaggi, legati soprattutto alla difficoltà di applicazione ai prodotti lavorati o blandamente cotti in relazione all'azione denaturante che i trattamenti fisico/chimici applicati nell'industria alimentare hanno sulle proteine. Risulta addirittura impossibile applicarlo in prodotti sterilizzati, per l'elevato grado di alterazione proteica (Moretti *et al*, 2003). Altri limiti nell'applicazione dell'IEF sono

date dall'omologia delle proteine in specie filogeneticamente correlate e dall'elevato polimorfismo di alcune proteine frequentemente osservato in alcune specie (Rehbein *et al*, 2003).

Di altro tipo sono le tecniche immunoenzimatiche come l'immunodiffusione e l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). L'ELISA sfrutta le reazioni tipiche del sistema immunitario, come quella tra antigene e anticorpo, per svelare la presenza o meno di una determinata proteina nel campione. Attualmente risulta però un metodo superato a causa del basso potere discriminante, soprattutto in caso di specie strettamente correlate, e della necessità di sviluppo di anticorpi specie-specifici, che rendono lunghi i tempi necessari per lo sviluppo di una tecnica analitica mirata (Asensio *et al*, 2007; Woolfe & Primrose, 2004).

Un ulteriore possibile approccio analitico nel settore riguarda l'utilizzo di tecniche cromatografiche, sostanzialmente riconducibili all'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Queste metodiche prevedono la separazione di molecole strutturalmente e chimicamente differenti, che vengono ripartite in due fasi immiscibili. Una delle due fasi, solitamente caratterizzata da uno stato fisico solido, è definita stazionaria, in quanto resta immobile durante il processo; l'altra invece, allo stato liquido, è definita mobile, in quanto è quella che fluisce attraverso il sistema cromatografico interagendo con la fase stazionaria. Il tipo di cromatografia attualmente più diffuso è quello su colonna. All'interno della colonna, che funge da supporto, si trova la fase stazionaria in forma di minuscole particelle costituite da materiale con caratteristiche chimiche ben precise. Esistono vari tipi di sviluppo cromatografico, quello più utilizzato è quello per eluizione, che consiste in una serie di processi di assorbimento ed estrazione del soluto. Ogni soluto è trattenuto con una forza diversa in conseguenza al diverso grado di interazione che si instaura tra le varie specie molecolari e la fase stazionaria, per cui minore sarà tale forza maggiore sarà la velocità con la quale il soluto eluisce dalla colonna. Ogni soluto viene quindi eluito in maniera sequenziale ed in ordine inverso rispetto alla grandezza che caratterizza la sua forza di interazione con la fase stazionaria. Numerosi studi sull'identificazione di specie ittiche hanno utilizzato questa metodica (Pineiro *et al*, 1997; Knuutinen & Harjula, 1998), ma il loro uso è essenzialmente limitato a campioni di pesce fresco piuttosto che a quello lavorato o trasformato. Ciò è dovuto al danneggiamento dei campioni in fase di lavorazione, in quanto le proteine, che costituiscono generalmente il *target* analitico, possono subire agglutinazione o degradazione durante i processi di produzione degli alimenti, andando così a rendere inutilizzabili le metodiche cromatografiche (Hubalkova *et al*, 2007).

6.1.3 Tecniche basate sull'analisi del DNA

I primi marcatori molecolari ad essere utilizzati nella genetica di popolazione sono stati quelli di natura proteica. Tuttavia, grazie ai grandi progressi nel campo dell'analisi del DNA e della biologia molecolare, ad oggi le metodiche che si basano sull'analisi degli acidi nucleici sono le più usate e trovano svariate applicazioni nel campo della pesca (Martinsohn, 2011). L'analisi del DNA è considerata l'approccio d'elezione per l'identificazione di specie in ambito ispettivo (Armani *et al*, 2012d; Bottero & Dalmaso, 2011). Essa si basa sul principio che gli individui di una stessa specie siano caratterizzati da una specifica sequenza nucleotidica che è diversa da quella di un individuo di un'altra specie (Pereira *et al*, 2008) o, eventualmente, appartenente ad un'altra popolazione. Il DNA rappresenta, per così dire, un "codice a barre" caratterizzante ogni specie, rendendolo un target analitico più vantaggioso rispetto alle proteine, per i seguenti motivi:

- l'elevata resistenza degli acidi nucleici a numerosi processi che avvengono durante la trasformazione degli alimenti: primo fra tutti la cottura, ma anche l'affumicatura, la salagione, l'acidificazione; questo determina una maggiore sensibilità, specificità e affidabilità di queste metodiche quando si lavora con campioni sottoposti a processi di produzione industriale (Lenstra & Lees, 2003). Tuttavia, tali processi possono comunque determinare una degradazione del DNA e quindi una sua frammentazione, influenzando negativamente l'efficienza analitica. Ciò nonostante è ancora possibile trovare frammenti di DNA di lunghezza fino a 300 bp in campioni di tessuti che hanno subito una sterilizzazione (Chapela *et al*, 2007). Alcuni studi indicano che è possibile identificare con il 90% di accuratezza una specie, applicando le tecniche di DNA *barcoding*, anche con frammenti di 100 bp. Nel caso di alimenti cotti e quindi di DNA frammentato è possibile utilizzare inoltre il mini DNA *barcoding* che prevede l'uso di sequenze più brevi rispetto alla tecnica classica (Meusnier, 2008); in uno studio esso è stato applicato ad un elevato numero di soggetti appartenenti alla famiglia *Sparidae*, ottenendo un'amplificabilità del 100 % su prodotti cotti e del 94 % su campioni conservati in etanolo (Armani *et al*, 2014).
- il DNA è ubiquitario: lo troviamo invariato in tutti i tipi di cellule, indipendentemente dal tessuto di origine (ossa, fegato, muscolo, etc...) e, a differenza delle proteine, indipendentemente da fattori come l'età, il tipo di tessuto e lo stato del soggetto (Civera, 2007).
- maggior facilità nel reperimento dei campioni: sono stati sviluppati, infatti, una varietà di metodi per rendere la raccolta e la conservazione di campioni di DNA molto semplice ed efficiente (Nsubuga *et al*, 2004, Sangha *et al*, 2003). I campioni di tessuto possono anche essere conservati con l'uso della formalina o della paraffina senza pregiudicare l'estrazione

dell'acido nucleico per il successivo svolgersi delle analisi (Pikor *et al*, 2011).

➤ maggiore numero di informazioni: dovuto all'elevato numero di sequenze nucleotidiche non codificanti e al maggior tasso di mutazioni a carico del DNA rispetto a quelle a carico delle proteine (Pereira *et al*, 2008).

Il DNA codifica l'informazione genetica che è decifrata durante la fase di trascrizione (sintesi RNA) e la fase di traduzione (sintesi proteica). L'informazione genetica viene copiata con un elevato livello di fedeltà durante il processo di replicazione (Martinson, 2011). Tuttavia, si possono verificare errori, anche se ad un tasso molto basso, per gli eucarioti circa una volta ogni 10^{10} nucleotidi trascritti (Alberts *et al*, 2002). Questi errori danno origine a mutazioni nella sequenza nucleotidica, chiamati polimorfismi. Le sequenze con loci polimorfici contengono un elevato grado di informazione e sono strettamente correlate al concetto di marcatore (o *marker*) molecolare, ovvero quei loci che, in conseguenza ad eventi di mutazione, contraddistinguono in modo caratteristico il tratto di genoma in cui sono localizzati e che consentono di rilevare la diversità tra individui appartenenti alla stessa specie o a specie diverse. Le caratteristiche di un buon *marker* per il riconoscimento di specie consistono nell'aver un basso polimorfismo intraspecifico ed, al contrario, un alto polimorfismo interspecifico. Queste caratteristiche ci consentono di avere una sequenza che sia quanto più uguale possibile all'interno della stessa specie, ma che presenti differenze con specie diverse, in modo da abbassare il margine di errore e ottenere un risultato chiaro e preciso nell'identificazione di specie. (Scialpi & Mengoni, 2008).

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati differenti tipi di marcatori molecolari, utilizzando tecniche di tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), VNTR o minisatellite (*Variable Number of Tandem Repeat*), SSR o microsatteliti (*Simple Sequence Repeat*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*), EST (*Expressed Sequence Tag*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). I marcatori molecolari applicati all'analisi del genoma hanno permesso di acquisire una enorme quantità di informazioni sulla struttura dei genomi stessi, nonché sulla natura dei geni e dei prodotti genici, ed hanno permesso soprattutto di analizzare l'organizzazione di singoli genomi e valutarne le relazioni filogenetiche.

6.1.3.1 Il DNA mitocondriale

Come target del riconoscimento di specie è possibile utilizzare sia il DNA nucleare che quello mitocondriale (*mtDNA*). Il DNA mitocondriale è indipendente dal DNA presente all'interno del nucleo della cellula; esso si trova all'interno dei mitocondri, organelli deputati a svolgere principalmente la funzione respiratoria. L'*mtDNA* consiste in una molecola di

DNA circolare a doppio filamento e contiene 12 geni codificanti per proteine, 22 geni codificanti per RNA transfer (tRNA), una regione non codificante e due geni che codificano per i ribosomi (Civera, 2003).

Il DNA mitocondriale presenta numerosi vantaggi rispetto a quello nucleare:

- evolve molto più velocemente rispetto al DNA nucleare: addirittura con un tasso 5-10 volte maggiore (Brown *et al*, 1979). Ciò è dovuto all'ambiente ricco di radicali liberi in cui si trova, ma anche al limitato numero di geni presenti ed al ruolo da essi svolto, che sembrerebbe essere causa di una minore accuratezza nei meccanismi di replicazione. Il suo elevato tasso di mutazione determina l'accumulo di numerose differenze utili a consentire la discriminazione di specie strettamente collegate (Armani *et al*, 2012d).
- viene ereditato soltanto per via materna: in ogni individuo è presente un solo allele per ogni gene, non avvengono, quindi, fenomeni di ricombinazione, ma solo fenomeni di mutazione, eliminando così i problemi legati all'eterozigosi (Asensio, 2007).
- l'elevato numero di copie: esso supera, di un fattore 10000, il numero di copie del DNA nucleare, questo perché nonostante ci sia un basso numero di geni rispetto al DNA nucleare, ogni mitocondrio possiede circa 10 copie del proprio genoma e ogni cellula possiede circa 1000 mitocondri. Questo rappresenta un gran vantaggio soprattutto nell'analisi di prodotti ittici lavorati in cui la degradazione rende inservibile ai fini dell'amplificazione parte del DNA presente nel campione (Civera, 2003).
- possiede dimensioni ridotte (da 16000 a 19000 nucleotidi) e struttura circolare: fattori che lo rendono più resistente agli stress termici e agli agenti denaturanti (Civera, 2003).
- la completa sequenza di *mtDNA* è conosciuta per un gran numero di specie ittiche in quanto parte di un processo sugli studi evuzionistici (Kocher *et al*, 1989; Palumbi *et al*, 2002).

I geni mitocondriali più utilizzati per l'identificazione delle specie ittiche (Rasmussen & Morrissey, 2008; Teletchea, 2009) sono quelli che codificano per la subunità I della Citocromo C Ossidasi (*COI*), per il citocromo b (*cytb*) e per la subunità 16s dell'RNA ribosomiale (*16srRNA*).

Il gene *COI* è riconosciuto, da alcuni autori, come il *target* di scelta per la discriminazione di specie, perché dotato di un potenziale discriminatorio maggiore rispetto agli altri geni (Hebert *et al*, 2003). Alcuni studi dimostrano che anche con piccole sequenze nucleotidiche, 200-400 bp, si riesce efficacemente ad ottenere una corretta identificazione (Hajibabaei, 2006). Per questo motivo sono stati sviluppati numerosi primer universali che possono essere utilizzati per l'amplificazione del DNA appartenente ad un elevato numero di taxa. Lo scopo principale dei ricercatori che operano in questo campo è quello di sviluppare primer capaci di

amplificare un tratto di un determinato gene nel maggior numero di specie possibile, all'interno di una strategia analitica che si avvale del processo di sequenziamento del DNA. Il gene *COI* è spesso il target di metodiche di DNA *barcoding*, un metodo molecolare che utilizza una corta sequenza di DNA per l'identificazione di specie. Per questo motivo molti studi sono stati condotti sullo stesso frammento di gene, chiamato "frammento di Folmer", di circa 706 bp. L'identificazione di specie utilizzando le sequenze del gene *COI* può tuttavia risultare insidiosa a causa della presenza di alcuni "frammenti" di DNA che determinano fenomeni di reazione crociata con il frammento target. In particolare, esistono degli pseudogeni mitocondriali nucleari le cui sequenze sono molto simili a quelle del gene *COI* e che, pertanto, sono spesso amplificati insieme ad esso compromettendo l'analisi filogenetica (Song *et al*, 2008). Oltre che per il DNA *barcoding*, il *COI* viene considerato il gene d'elezione anche in altre tecniche molecolari, quali la PCR-RFLP e la multiplex PCR (Espineira *et al*, 2008; Rasmussen *et al*, 2010).

Il gene *cytb* è stato usato in più della metà degli studi filogenetici degli ultimi dieci anni. Il suo grado di variabilità inter-specifica è molto più alto di quello intra-specifico e ciò l'ha reso adatto agli studi d'identificazione di specie (Barlett & Davidson, 1991). È interessante notare come questo gene possieda sia regioni con elevata variabilità, utili per gli scopi identificativi, sia sequenze molto conservate utili per la progettazione di primer universali (Kochzius *et al*, 2010).

Il gene *16s rRNA*, invece, è un gene molto conservato. Questo ne facilita l'uso per la progettazione di primer universali, ideati da Palumbi *et al* (2002), che consentono l'amplificazione dello stesso frammento di DNA da un ampio numero di specie, anche filogeneticamente distanti. Per questo motivo l'amplificazione del *16s rRNA* è spesso utilizzata come controllo positivo nelle reazioni di amplificazione del DNA, soprattutto nel caso di campioni con elevato grado di degradazione degli acidi nucleici (Armani *et al*, 2012b).

Una volta scelta il DNA target, questo può essere analizzato con differenti metodiche, in particolare, quelle basate sulla PCR, sono attualmente le più usate, perché presentano vantaggi in quanto a rapidità, specificità e sensibilità (Lockley & Bardsley, 2000).

6.2 Metodiche di estrazione degli acidi nucleici

L'isolamento e la purificazione degli acidi nucleici sono i primi passi nella maggior parte delle applicazioni di biologia molecolare. L'ottimizzazione dell'estrazione dipende:

- dal tipo di acido nucleico che si vuole isolare (DNA o RNA);
- dalla fonte utilizzata per l'estrazione (tessuti animali o vegetali, cellule eucariotiche o procariotiche, etc...);
- dal materiale biologico contenente la fonte degli acidi nucleici usato per

l'estrazione (organo intero, sangue, etc...);

- dall'applicazione prevista nel post-estrazione.

Indipendentemente dalla tecnica di estrazione usata, essa deve rispondere a due requisiti principali: la resa e la purezza, intesa sia come presenza in soluzione dell'acido nucleico in esame, sia come assenza di sostanze contaminanti che, legandosi ai reagenti in soluzione, potrebbero modificare i risultati delle successive applicazioni (Focà & Lamberti, 2003). Una buona preparazione di DNA genomico è alla base della buona riuscita di qualunque analisi di biologia molecolare. Normalmente è sufficiente che durante la purificazione il DNA si mantenga in frammenti di 50-100 kilobasi (kb) per poter effettuare qualsiasi analisi successiva. Dopo aver scelto il campione biologico da cui estrarre il materiale genetico, il percorso di estrazione e purificazione prevede quattro fasi:

- lisi delle cellule. La distruzione della membrana cellulare è una fase delicata in quanto risultato di due eventi contrastanti: da una parte l'esigenza di frammentare il materiale di partenza, dall'altra quella di non alterare in alcun modo gli acidi nucleici da analizzare. I metodi tradizionali si basano su trattamenti complessi che includono la digestione enzimatica, la solubilizzazione tramite detergente o tecniche meccaniche di spaccatura. Esistono inoltre metodi di lisi basati su shock osmotico (Cunha *et al*, 2010) ed ultrasuoni.
- inattivazione delle nucleasi cellulari. L'inattivazione delle proteine cellulari avviene in maniera diversa a seconda se il materiale genetico da estrarre è rappresentato da DNA o RNA. Quando l'acido nucleico è il DNA, si utilizza la proteinasi K, una proteinasi molto attiva, isolata dal fungo saprofito *Tritirachium album*, che digerisce le proteine associate all'acido nucleico ed inattiva tutte le nucleasi cellulari. Nel caso dell'RNA invece, i tessuti o le cellule sono omogenizzate in un tampone contenente un detergente ad alta concentrazione (SDS o Sarcosyl), un agente dissociante (cloruro o isotiocianato di guanidinio), una soluzione tampone (acetato) ed un agente riducente (2-mercaptoetanololo o DTT), in modo da inibire le RNAasi endogene, denaturare gli acidi nucleici e dissociare le proteine che potrebbero esservi fissate (Focà *et al*, 2003).
- separazione e recupero dell'acido nucleico dalla soluzione contenente il lisato cellulare, con separazione dell'acido nucleico dai residui cellulari e dalle sostanze interferenti. I metodi classici prevedono l'utilizzo di solventi organici come il fenolo ed il cloroformio. Il fenolo è un potente denaturante delle proteine in quanto, legandosi ad esse attraverso legami a idrogeno, ne altera la struttura. Le proteine denaturate, con i gruppi idrofobici esposti, diventano solubili nella fase fenolica o precipitano all'interfase fenolo acqua; il fenolo è fortemente igroscopico, e deve essere sempre equilibrato con una soluzione tampone perché altrimenti assorbirebbe la soluzione acquosa contenente gli acidi nucleici. Il cloroformio

completa la denaturazione delle proteine, rimuove i lipidi e, grazie alla sua elevata densità, facilita la separazione della fase acquosa (contenente il DNA deproteinizzato) da quella organica (fenolica), stabilizzando l'interfaccia tra le due fasi. Un metodo alternativo per la separazione della componente proteica dagli acidi nucleici è l'estrazione *salting out*, che sfrutta il principio secondo il quale, ad alte concentrazioni di sali, la solubilità delle proteine diminuisce bruscamente causando la precipitazione delle stesse. Questo metodo prevede la lisi delle cellule mediante tampone di lisi classico e il trattamento con la proteinasi K allo scopo di estrarre gli acidi nucleici e degradare le proteine presenti che vengono allontanate mediante precipitazione con i sali (solfato di ammonio, solfato di sodio, acetato di sodio).

➤ precipitazione. Avviene di solito in alcool etilico o isopropanolo e permette il recupero degli acidi nucleici in forma solida. Dopo lavaggio con etanolo, si ha una valutazione qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici estratti (per via spettrofotometrica) e quindi la loro conservazione (Focà *et al*, 2003).

In alternativa ai metodi di estrazione precedentemente citati (metodo classico fenolo/cloroformio e metodo *salting out*), esistono in commercio numerosi kit di isolamento e purificazione, molti dei quali basati sull'utilizzo di matrici silicee. Si sfrutta in questo caso la tendenza del DNA ad adsorbirsi alla matrice silicea in presenza di alte concentrazioni di sali caotropici, in particolare idrocloruro e isotiocianato di guanidina (Focà *et al*, 2003).

6.3 La reazione a catena della polimerasi (PCR)

(Scialpi & Mengoni, 2008; Guidi *et al*, 2008)

La reazione a catena della polimerasi, comunemente nota con l'acronimo PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una delle più comuni metodiche impiegate nei laboratori di biologia molecolare, genetica e microbiologia. Essa è stata sviluppata dal biochimico statunitense Kary Mullis negli anni '80 e da allora ha rivoluzionato il mondo dell'analisi genomica. La maggior parte dei lavori che sfruttano l'analisi del DNA si basano sull'utilizzo della PCR per amplificare specifici frammenti di interesse (Asensio, 2007). La PCR consente di ottenere un numero molto elevato, nell'ordine di milioni, di identiche molecole del tratto di DNA che si è scelto di amplificare, di cui si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziali e finali, anche a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico iniziale; solitamente si usano pochi picogrammi, anche se teoricamente la reazione funzionerebbe anche solo con una singola molecola di DNA stampo.

Esistono numerose varianti che rappresentano un miglioramento o un'ottimizzazione della procedura per scopi analitici diversi. La PCR e le sue varianti trovano largo impiego nel controllo degli alimenti nel comparto ittico in quanto utili nell'identificazione di specie destinate al consumo umano, permettendo di rilevare possibili frodi legate alla falsa

dichiarazione in etichetta delle specie costituenti il prodotto alimentare.

La tecnica della PCR si basa sulla sintesi ciclica *in vitro* di un singolo frammento di DNA per mezzo di un enzima, la DNA polimerasi, che appartiene alla categoria delle transferasi e catalizza la reazione di aggiunta di nucleotidi al filamento di DNA, partendo da una sequenza di oligonucleotidi, i primer.

I primer sono sequenze nucleotidiche (lunghezza media 20 basi) la cui funzione è quella di legarsi a ben precisi segmenti sulla singola elica di DNA a cui sono complementari e di delimitare in questo modo la zona scelta come *target*. Una volta inseriti all'estremità 3' delle due catene della doppia elica i primer fungono da inneschi per l'aggiunta di nucleotidi, reazione catalizzata dalla polimerasi, producendo così l'allungamento del filamento in direzione 5'. Quello che rende specifica la reazione è l'utilizzo di primer specifici: questo ci consente di amplificare sola la parte di DNA *target* scelta, nonostante nel nostro campione sia presente una quota maggioritaria di DNA che costituisce il corredo genomico di ogni cellula. Anche le condizioni in cui avviene la reazione ne favoriscono la specificità. Esse sono definite per ogni tipo di PCR in modo da favorire, in particolare, l'appaiamento tra oligonucleotidi e regioni bersaglio predefinite.

La reazione prevede il succedersi di cicli di amplificazione nel quale si alternano tre fasi caratterizzate da specifiche condizioni, quali la temperatura e la durata. Durante ogni ciclo il DNA *target* si raddoppia; questo significa che la quantità di filamenti che otteniamo dipende dal numero di molecole iniziali e che il processo avviene in maniera esponenziale fino ad una fase di *plateau*. Le tre fasi sono:

- denaturazione della doppia elica del DNA stampo in due singole eliche, con temperature di circa 95° C;
- appaiamento dei primer delle sequenze complementari di DNA a singola elica localizzati all'estremità del frammento bersaglio, a temperature comprese tra 50° e 70° C;
- estensione dei primer in direzione 5'-3' mediante l'aggiunta di nucleotidi operata dalla DNA polimerasi e che porta infine alla sintesi di una nuova elica uguale al DNA stampo di partenza, a temperature comprese tra 68° e 72° C.

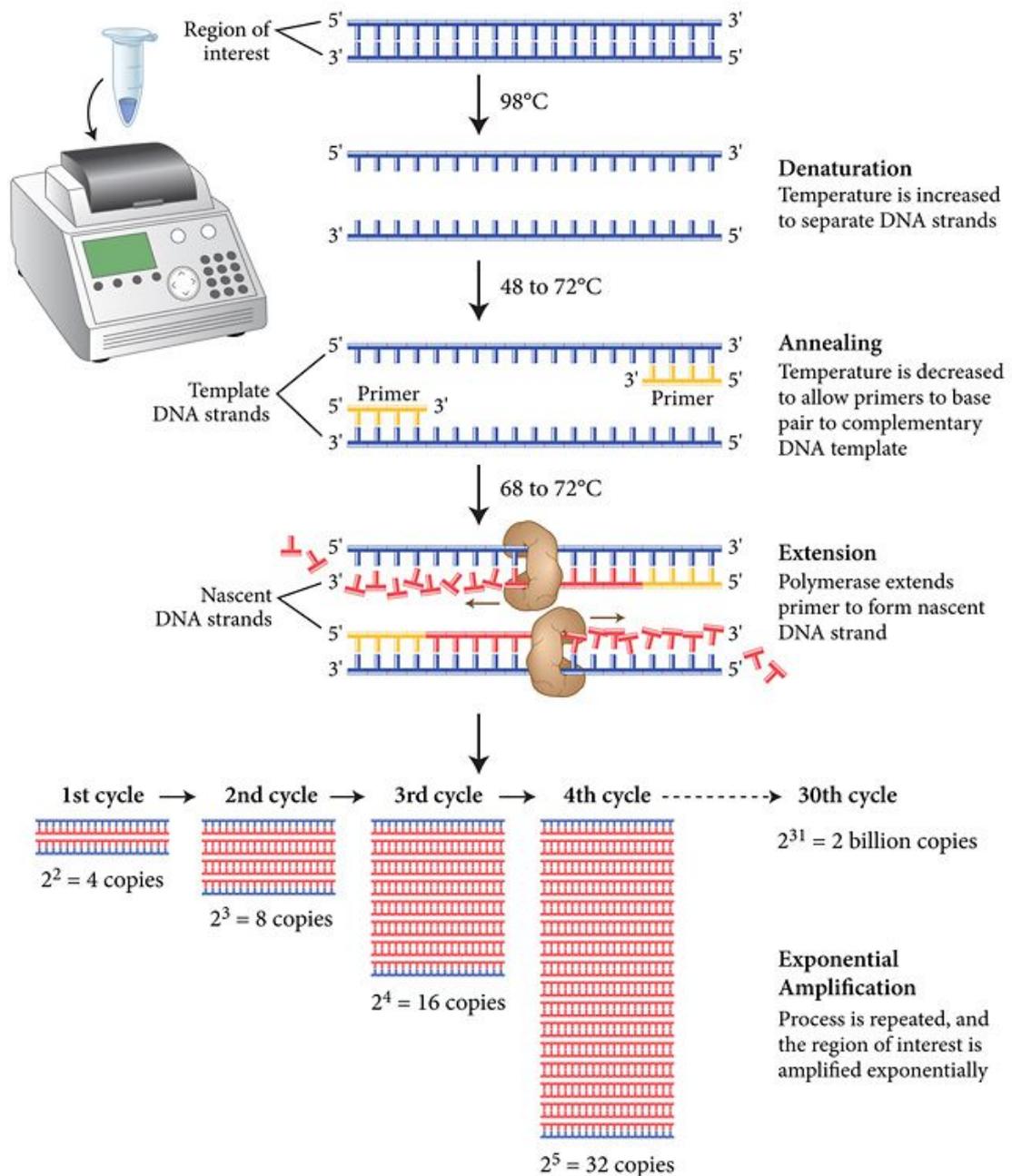


Fig. 6.1: fasi della PCR (Fonte: <http://www.neb.com>)

I cicli sono in media ripetuti 30-40 volte, sufficienti per ottenere una quantità rilevabile di DNA, anche se questa dipende in gran parte anche dalla concentrazione iniziale dell'acido nucleico. È da considerare, inoltre, che, pur essendo una reazione che segue un andamento esponenziale, l'effetto dei cicli non è sempre proporzionale al loro numero, in quanto si osserva, nelle fasi finali, un effetto plateau dovuto a diversi fattori, tra cui la degradazione dei reagenti.

Per poter effettuare una reazione di PCR sono coinvolti numerosi altri elementi, oltre al

DNA, necessari per ottenere una reazione ottimale ed efficiente:

- primer specifici che individuano la sequenza bersaglio da amplificare. Essi sono complementari all'estremità 3' delle due catene della doppia elica. Hanno una doppia funzione, quella di fungere come inneschi ovvero come sequenza da allungare e quella di identificare uno specifico segmento di DNA da amplificare;
- desossiribonucleotidi trifosfati(dNTP) necessari per la sintesi della nuova molecola in quanto sono gli elementi che vanno a ricostruire la sequenza complementare a quella *target*;
- DNA polimerasi, un'enzima termostabile che si lega ai primer e che catalizza la reazione di sintesi della nuova catena. L'enzima fu isolato per la prima volta nel 1988 dal batterio *Thermus aquaticus* e per questo motivo chiamato Taq DNA polimerasi. La temperatura ideale in cui opera la Taq DNA polimerasi è intorno a 72° C. Attualmente ne esistono di diversi tipi, sia nativi che ricombinanti;
- tampone di reazione (buffer), una miscela contenente vari sali e contribuisce a dare stabilità alla reazione sia mantenendo il pH a livelli ottimali (8-9 a seconda della Taq) sia a creare la giusta osmolarità. Esso ha ulteriori ruoli, uno è quello di essere un cofattore essenziale per la DNA polimerasi per il caricamento dei nucleotidi;
- dicloruro di magnesio (MgCl₂), come cofattore della DNA polimerasi, in particolare la sua concentrazione influenza l'appaiamento dei primer allo stampo e quindi la specificità dell'appaiamento in modo proporzionale alla concentrazione del sale;

Descrizione delle tre fasi della PCR:

- denaturazione: il DNA stampo viene denaturato ad una temperatura di 95° C per 30-60 secondi ad ogni ciclo di amplificazione. Una temperatura tanto elevata, infatti, riesce a separare le due eliche interrompendo i legami idrogeno esistenti tra le basi azotate dei due filamenti; la Taq polimerasi non si deteriora particolarmente in quanto in grado di resistere a tale condizione per almeno 30 minuti, a patto che i cicli totali di PCR non siano superiori a 30-35. Dall'altro lato, temperature troppo basse, così come cicli troppo brevi, potrebbero non essere sufficienti a denaturare la doppia elica, riducendo così l'efficienza della reazione.
- appaiamento (annealing) dei primer con il DNA stampo a singola elica ad una temperatura di circa 55° C per 30-60 secondi (talvolta si preferisce ridurla ulteriormente a 45-48° C); precisamente, la temperatura di *annealing* (Ta) dipende anzitutto dalla percentuale dei diversi nucleotidi presenti nei primer (maggiore è il contenuto di Adenina-Timina, minore sarà la Ta poiché ci sono meno legami idrogeno), nonché dalla loro stessa lunghezza (in genere deve essere almeno di 18-28 bp). La temperatura di *melting* (definita come la temperatura alla quale metà del DNA si trova nello stato a doppia elica, e l'altra metà in quello denaturato), su cui basare quella di *annealing*, si può facilmente ricavare dalla formula:

$$T_m = [4(G+C)+2(A+T)]^{\circ}C.$$

Si rende infatti necessario sottolineare la necessità di utilizzare programmi che consentano un appaiamento dei primer alle relative sequenze complementari di DNA che sia il più specifico possibile, ricordando che, a temperature eccessivamente basse, essi tenderanno ad appaiarsi casualmente, in modo poco specifico; viceversa, a temperature troppo elevate, non si appaieranno per niente. Stesso concetto riguarda il tempo di *annealing*, che non deve essere troppo lungo (appaiamenti a stampi con bassa complementarietà) né troppo corto (rischio che i primer non si appaino). L'appaiamento dei primer è fondamentale per la riuscita della fase successiva.

- Estensione (*elongation*) dei primer, da parte della Taq polimerasi mediante aggiunta di nucleotidi (dNTP) con sintesi di una nuova elica complementare al DNA stampo. La temperatura utilizzata in questa terza fase è compresa tra 68° e 72° C, in modo che l'enzima possa operare al meglio (in genere riesce ad estendere i primer ad una velocità di circa 100 basi/sec), mentre il tempo di estensione (intorno ai 60 secondi) varia in base alla lunghezza del DNA stampo.

Attualmente, la reazione di PCR è condotta tramite strumenti automatici, chiamati termociclatori, che consentono di impostare parametri quali il numero di cicli, le temperature per ogni ciclo e la durata di ogni fase del ciclo.

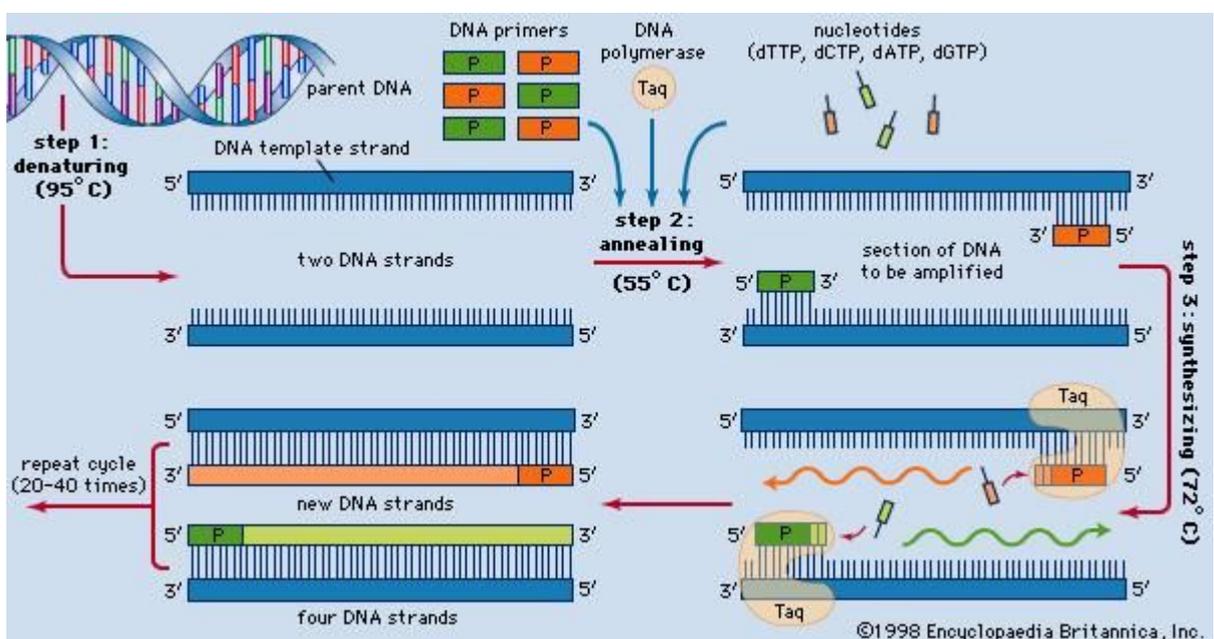


Fig. 6.2: fasi dettagliate della PCR (Fonte: www.britannica.com)

Tra le tecniche utilizzate per l'identificazione di specie ittiche, ognuno dei quali prevede una fase di amplificazione del DNA tramite PCR, troviamo la PCR multiplex, il FINS

(*Forensically Informative Nucleotide Sequencing*), l'RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*).

6.3.1 Modificazioni chimiche del DNA negli alimenti

Il DNA estratto da matrici alimentari è spesso molto degradato e quindi presente in piccole quantità in seguito ai trattamenti subiti durante la lavorazione. Per questo motivo la possibilità di poter identificare ed amplificare mediante PCR tale DNA in modo corretto diminuisce drasticamente rispetto a DNA estratti da matrici non lavorate. La lavorazione industriale dei prodotti alimentari, infatti, comporta spesso processi caratterizzati da trattamenti termici (cottura, sterilizzazione, pastorizzazione), alte pressioni, modificazioni del pH, irradiazioni e reidratazioni, che possono alterare notevolmente la stabilità della molecola di DNA. Bauer *et al* (2003) hanno ad esempio evidenziato come durante il trattamento a caldo nella preparazione del tofu dalla soia, i frammenti di DNA individuabili erano inferiori alle 1000 bp. La temperatura rappresenta tuttavia un elemento trascurabile rispetto ad altri fattori, quali eventuali enzimi degradativi presenti negli ingredienti, o le condizioni chimiche a cui avviene il processamento, che possono accelerare la degradazione del DNA, tra cui il pH risulta essere uno dei parametri più influenti. Lindahl & Nyberg (1972) hanno dimostrato che il grado di depurinazione del DNA aumenta fortemente con la riduzione del pH; poiché la depurinazione è una delle principali reazioni iniziali che portano alla rottura del filamento di DNA, si può affermare che l'incremento del grado di rottura, così come la conseguente degradazione del DNA, a pH 4 è ampiamente dovuta alla reazione di depurinazione per catalisi acida. A conferma di ciò, altri studi hanno dimostrato che nei prodotti a base di pomodoro, come il ketchup, si trovavano frammenti di DNA con lunghezza media inferiore a 400 bp (Hemmer, 2002). Una rottura del DNA dipendente dal pH è stata osservata anche durante la produzione di prodotti da forno ed in prodotti della pesca marinati (Moser *et al*, 1999; Armani *et al*, 2012d).

6.3.2 Contaminanti e inibizione della PCR

Al di là dei processi di degradazione, esistono casi in cui l'efficienza delle tecnologie molecolari può venire meno a causa della presenza di determinate sostanze ad azione inibitrice coestrate insieme al DNA. Tale fenomeno rappresenta uno dei principali problemi nelle successive analisi del campione e soprattutto nella reazione della PCR, in quanto queste sostanze sono in grado di ridurre, o addirittura bloccare, la capacità di amplificazione degli acidi nucleici (Lantz *et al*, 2000). Si tratta di contaminanti originariamente presenti nel campione o derivati dai successivi processi di manipolazione e preparazione dello stesso, o addirittura da entrambe le fonti (Rossen *et al*, 1992). La letteratura riporta quali principali

sostanze inibitrici i sali biliari nelle feci, i polisaccaridi complessi nelle feci e nei campioni vegetali, gli acidi umici nel suolo e nei campioni vegetali, il collagene nei tessuti, l'emoglobina e le immunoglobuline nel sangue, la mioglobina nei tessuti muscolari, l'urea nelle urine, le proteinasi e gli ioni calcio nel latte (Radstrom *et al*, 2004). Un'altra importante causa di inibizione della reazione di PCR è data dai composti che vengono in contatto con il DNA durante le fasi di preparazione del campione: tra questi, si ricordano il cloruro di sodio o di potassio (utilizzati in eccesso), i detergenti ionici come il sodio desossicolato, sarcosyl e SDS (Weyant *et al*, 1990), l'etanolo e l'isopropanolo (Loffert, 1997), il fenolo (Katcher & Schwartz, 1994). I più importanti inibitori del DNA delle matrici alimentari comprendono i composti organici e fenolici, i polisaccaridi, il glicogeno, i grassi, il collagene, i metalli come ferro e cobalto (Wilson, 1997), eventuali residui di cellule batteriche e qualsiasi DNA estraneo all'analisi.

I meccanismi inibitori da parte delle suddette sostanze sono essenzialmente tre: inattivazione della DNA polimerasi (da parte di enzimi proteolitici, etc...), degradazione o cattura degli acidi nucleici (degradazione può avvenire per fenomeni di idrolisi, metilazione non enzimatica, danno ossidativo, degradazione enzimatica; la cattura può verificarsi ad opera di cellule batteriche, detriti, proteine e polisaccaridi) e interferenza con i processi di lisi cellulare (Wilson, 1997).

Per far fronte al problema degli inibitori, a livello laboratoristico è possibile ricorrere ad alcuni accorgimenti in grado, se non di ottimizzare le tecniche analitiche, quantomeno di limitare i danni apportati da tali sostanze. Il DNA estratto può infatti essere diluito prima dell'amplificazione, in modo da ridurre anche la concentrazione degli inibitori; può inoltre essere aggiunta alla soluzione di reazione una quantità maggiore di Taq, in modo da far sì che una parte di molecole dell'enzima leghino gli inibitori rimuovendoli dalla reazione, mentre altre rimangono libere per agganciare i primer; ancora, può risultare utile ricorrere all'utilizzo di polimerasi diverse dalla Taq classica quali ad esempio la Klein Taq; infine, è possibile inserire in soluzione particolari additivi in grado di contrastare l'azione delle sostanze inibitrici, quali il dimetisolfossido (DMSO), dimetilformamide (DMF), glicerolo, etc... (Scialpi *et al*, 2008).

6.4 Elettroforesi (Mathews *et al*, 2004)

L'analisi della PCR è solitamente effettuata mediante corsa elettroforetica che permette di riconoscere i frammenti amplificati in base alla dimensione attesa nota, poiché determinata dalla sequenza compresa tra i due primer utilizzati.

Questo è possibile poiché la PCR produce un numero di copie del frammento di interesse sufficientemente alta da essere visibile a occhio nudo se legato ad una molecola colorata o

fluorescente.

L'elettroforesi è un processo elettrocinetico nel quale molecole e particelle cariche, in soluzione acquosa, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano in direzione del polo che ha la carica opposta. Grazie alla presenza di gruppi fosfato le molecole di DNA sono cariche negativamente e quindi, se sottoposte ad un campo elettrico, migrano verso il polo positivo.

Nel caso delle molecole biologiche, come acidi nucleici e proteine, è particolarmente indicata la separazione elettroforetica su mezzo stabilizzante come poliacrilammide o gel di agarosio. L'agarosio è un polisaccaride preparato per purificazione dell'agar, che per riscaldamento e successivo raffreddamento forma un gel solido provvisto di una certa porosità. A seconda della concentrazione dell'agarosio i pori del gel sono più o meno grandi: le molecole di DNA passano attraverso i pori del gel e, a seconda della propria lunghezza, percorrono una distanza più o meno lunga.

La velocità di migrazione dipende da più fattori, tra cui la dimensione del DNA (molecole grandi migrano lentamente, molecole piccole migrano velocemente), e la sua conformazione (la forma superavvolta corre più veloce perché più compatta; quella circolare corre più lenta perché più ingombrante; quella lineare corre a una velocità intermedia tra le due precedenti), la concentrazione di agarosio nel gel (i pori del gel hanno dimensione diversa a seconda della concentrazione utilizzata), il voltaggio applicato (circa 5 Volt/cm) e la composizione del *buffer*.

Per consentire la visualizzazione degli acidi nucleici migrati si possono utilizzare diversi tipi di coloranti; quello più usato in assoluto è il bromuro d'etidio. Questa molecola planare si inserisce tra le basi dell'acido nucleico a doppio filamento, ed emette luce fluorescente quando irradiata con luce ultravioletta (300 nm). È una sostanza cancerogena per cui va usata con cautela, impiegando i guanti e la cappa. Per questo motivo sono stati sviluppati altri tipi di coloranti: Gel Red, sali di argento, blu di metilene.

6.5 Applicazioni della tecnica PCR

6.5.1 PCR multiplex

Un'evoluzione della PCR è rappresentata dalla PCR multiplex, dove più coppie di primers vengono utilizzate per amplificare simultaneamente differenti sequenze nella stessa reazione. Tuttavia, questa metodica necessita una fine messa a punto per evitare inconvenienti che possano inficiare la bontà del metodo stesso. Un esempio è dato dal fatto che tutte le coppie di primers devono funzionare nelle stesse condizioni di amplificazione con il rischio che possa verificarsi la formazione di dimeri di primer con conseguente diminuzione della sensibilità del test e/o l'amplificazione preferenziale di alcuni bersagli rispetto ad altri. I primer devono generalmente avere un valore 10^7 molare in eccesso rispetto al DNA. Se questo rapporto è

troppo basso si ha una riduzione della resa della reazione di PCR (Markoulatos *et al*, 2002). Anche la scelta della temperatura di *annealing* è di fondamentale importanza, in quanto ogni primer presenta una temperatura ottimale. Per favorire l'omogeneità della reazione si tende ad utilizzare primer con una temperatura di *melting* più vicina possibile. Molti lavori sono stati effettuati con questa tecnica nel campo del riconoscimento di specie ittiche; Trotta *et al* (2005) hanno discriminato alcune specie di cernia appartenenti al genere *Ephinephelus* e *Mycteroperca* dalle specie con cui sono comunemente sostituite quando presentate in forma di filetti; Catanese *et al* (2010) hanno utilizzato la PCR multiplex per identificare alcune specie di sgombro appartenenti al genere *Scomber* in prodotti che hanno subito processi industriali inclusi quelli inscatolati e sterilizzati.

6.5.2 Tecniche che prevedono il sequenziamento: FINS e DNA Barcoding

Il sequenziamento è il metodo più diretto per ottenere informazioni dai prodotti della PCR. Esso ci fornisce l'esatta sequenza dei nucleotidi componenti l'acido nucleico. La reazione di sequenziamento ad oggi maggiormente utilizzata nei laboratori è quella basata sul metodo di Sanger, nel quale è prevista un'ulteriore amplificazione del frammento d'interesse con quella che viene definita "PCR di sequenziamento". Questa differisce da una PCR classica in quanto vengono utilizzati dei dideossinucleotidi marcati (ddNTP) con quattro fluorocromi differenti. L'incorporazione di tali ddNTPs interrompe l'azione della polimerasi, portando alla formazione di una molecola di DNA fluorescente. Infatti, la mancanza di un secondo gruppo idrossilico nel ddNTP in posizione 3' non permette la formazione di un legame fosfodiesterico fra questo e l'atomo di carbonio in posizione 5' del nucleotide successivo. L'incorporazione casuale dei ddNTP fa sì che alla fine della reazione, invece di ottenere molecole della stessa lunghezza, si ottengono frammenti di diversa lunghezza a seconda del ddNTP che è stato incorporato. La lettura attraverso un fascio laser dei prodotti di amplificazione produrrà dei picchi di differente lunghezza d'onda per ogni dideossinucleotide-fluorocromo. L'altezza di un picco dipende dall'intensità con cui un gruppo di molecole risponde all'eccitazione laser. La successiva lettura dei picchi permette di risalire all'esatta disposizione dei nucleotidi sulla sequenza (Sanger *et al*, 1977). Numerosi lavori sono stati svolti utilizzando il sequenziamento al fine di ottenere delle metodiche da utilizzare per il controllo degli alimenti nel comparto ittico (Dawnay *et al*, 2007; Smith *et al*, 2008; Cutarelli *et al*, 2014).

Il sequenziamento sta alla base della metodica FINS, anch'essa è stata applicata nel comparto ittico; in uno studio di Espineira *et al* (2008), che utilizza il FINS sono state identificate correttamente le sette specie appartenenti al genere *Lophius* analizzando un frammento di 699 bp del gene *COI*. Inoltre tale metodica è stata impiegata da Armani *et al* (2013) per rivelare un'alta percentuale di *mislabeling* in prodotti alimentari a base di medusa,

analizzando un corto frammento del gene *COI*.

Paul Hebert, nel 2003 ha proposto un nuovo metodo per accelerare il processo di identificazione delle specie: utilizzare brevi sequenze di DNA in modo analogo ai codici a barre dei supermercati (c.d. DNA *barcoding*). Secondo Hebert, ogni specie potrebbe essere “etichettata” con una sequenza nucleotidica di DNA univocamente associata a quella specie, da utilizzare come riferimento per comparare la sequenza di DNA di una potenziale nuova specie. Una delle più importanti componenti di questa iniziativa è stata la costruzione di un *database* pubblico contenente tutte le sequenze delle specie già identificate in modo da poter confrontare le sequenze ottenute in laboratorio con quelle disponibili e catalogate negli anni. I *database* sono una preziosa fonte di sequenze di differenti tratti di DNA di moltissime forme viventi. Uno dei più importanti è GenBank accessibile all’indirizzo: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Questo database, tuttavia, non risulta adatto nella sicura identificazione di specie in ambito ispettivo basata sull’analisi BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) in quanto non è prevista alcuna forma di controllo sulle informazioni inserite. Per far fronte a ciò sono nate diverse iniziative con l’obiettivo di costituire banche dati sicure dal punto di vista dei controlli delle sequenze depositate. Tra questi, i più accreditati sono il consorzio del *Barcoding of Life* (BOLD), il consorzio *Fishtrace* e il consorzio *Fishgene*. Il consorzio del *Barcoding of Life* si pone l’obiettivo di raccogliere le sequenze del gene della citocromo-ossidasi subunità I (*COI*), eletto a target ufficiale in quanto particolarmente promettente per l’identificazione delle specie animali. Questo gene, infatti, presenta una variabilità limitata nell’ambito della stessa specie, mentre il grado di variabilità aumenta in individui appartenenti a specie diverse. Il BOLD è accessibile dal sito www.boldsystem.org. Il consorzio *Fishtrace* si pone l’obiettivo di individuare i polimorfismi utili a identificare le diverse popolazioni di pesci delle acque europee ed fornire informazione a partire dalle sequenze del gene mitocondriale del citocromo b e del gene nucleare della rodopsina. Il consorzio *Fishgene* ha come obiettivo quello di creare un *database* per l’identificazione dell’origine del pesce, permettendo anche l’identificazione dei diversi stock ittici con la combinazione di differenti tecniche molecolari (Bernardi *et al*, 2011).

CAPITOLO 7:

SCOPO DELLA TESI

Data l'importanza e l'impatto delle frodi per sostituzione nel comparto dei prodotti della pesca sull'economia, sull'ambiente e sulla sicurezza del consumatore, e vista l'elevata percentuale di *mislabeled* riscontrata nei prodotti a base di medusa commercializzati sul territorio Europeo, lo scopo di questa tesi è stato quello di sviluppare una metodica analitica, basata sulla tecnica della multiplex PCR, capace di identificare le 5 specie edibili di medusa (*Rhopilema esculentum*, *Nemopilema nomurai*, *Pelagia noctiluca*, *Rhizostoma pulmo* e *Cotylorhiza tuberculata*), maggiormente sfruttate a scopo commerciale. In particolare, tale tecnica può apportare vantaggi in termini di costi e di tempo rispetto alle metodiche preesistenti in quanto può essere utilizzata come test rapido di *screening* per l'identificazione di specie.

CAPITOLO 8:

MATERIALI E METODI

8.1 Campioni di riferimento

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati 66 campioni di riferimento appartenenti a 5 famiglie di *Rhizostomeae* (*Cassiopeidae*, *Catostylidae*, *Cepheidae*, *Lychnorhizidae*, *Rhizostomatidae*) e a 3 famiglie di *Semaeostomeae* (*Cyaneidae*, *Pelagiidae*, *Ulmaridae*). Di questi, 54 provenivano da uno studio preliminare (Armani *et al*, 2013), mentre i restanti 12 sono stati raccolti nel presente studio; tra questi, 3 campioni di DNA appartenenti alla *Rhizostoma luteum* identificati in uno studio condotto da Prieto *et al* (2013) e 9 campioni di tessuto conservati in etanolo identificati a livello di genere e specie sulla base di caratteristiche morfologiche, appartenenti alle specie *Aurelia aurita*, *Pelagia noctiluca* e *Cotylorhiza tuberculata* gentilmente forniti da *Institute of Sciences of Food Production of the National Research Council of Lecce* (vedi tabella 8.1 in appendice 2). Infine, sono stati inclusi anche 6 campioni di *P. benovici* sequenziati nello studio di Piraino *et al*, 2014 (sequenze disponibili su GenBank: KJ573409-KJ573414).

Inoltre sono stati utilizzati 78 campioni di prodotti commerciali (48 RE-“*Ready to eat*” e 30 CP-prodotti in salamoia) provenienti da uno studio preliminare (Armani *et al*, 2013)

8.2 Estrazione del DNA totale con il protocollo standard (Armani *et al*, 2014b)

8.2.1 Estrazione del DNA

Tutti i 9 campioni raccolti in questo studio hanno subito un trattamento di lavaggio/reidratazione in Tris-base 100 mM a pH 7.8 per una durata di 30 minuti a temperatura ambiente, in agitazione continua su un agitatore tipo Vortex-Genie®, digital (Scientific industries, Inc NY, 11716 USA).

Si è proceduto all'estrazione del DNA dei 9 campioni di riferimento.

L'estrazione del DNA è stata condotta a partire da circa 20 mg di tessuto ed è stata effettuata secondo il protocollo proposto da Armani *et al* (2014b), con alcune modifiche alla fase di digestione che è stata condotta in agitazione continua su termoblocco autoriscaldante (T-shaker Euroclone S.p.A 27010, Siziano, Pavia, Italia) riducendo il tempo di incubazione ad 1h.

Di seguito sono riportati le soluzioni e i reagenti utilizzati e le fasi del protocollo estrattivo in forma schematica:

Soluzioni e reagenti

- *Buffer* di lisi: Tris-base 500 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 2 %

- Tampone Fosfato: NaH₂PO₄ 300 mM pH 8
- Proteinasi K 20 mg/ml
- Acetato di Sodio 4 M pH 8.3
- Isopropanolo puro
- Etanolo 70 %, 100 %

Protocollo estrattivo:

1) Preparazione del campione e lisi meccanica: in una provetta da 2 ml sono stati aggiunti 100 µl di NaH₂PO₄ e 10 µl di Proteinasi K 20 mg/ml ogni 100 mg di tessuto. Il tessuto è stato poi finemente sminuzzato con forbici;

2) Digestione enzimatica: i campioni sono stati posti in agitazione continua su termoblocco per 1h a 60° C; a termine del periodo di incubazione il digesto è stato centrifugato a 15-16000 rpm per 2 minuti per separare il surnatante liquido dai detriti cellulari;

3) *Salting out* delle proteine: misurato il volume, la fase liquida è stata trasferita in una nuova provetta da 2 ml e sono stati aggiunti 0,5 volumi di Acetato di Sodio 4 M; il campione è stato poi mescolato, lasciato a RT (temperatura ambiente) per 5 minuti e infine centrifugato a 15-16000 rpm per 5 minuti;

4) Precipitazione del DNA: il volume del surnatante è stato raccolto e misurato; sono stati poi aggiunti 0,6 volumi di isopropanolo; il campione è stato poi mescolato, lasciato a RT per 10 minuti ed infine centrifugato nuovamente a 15-16000 rpm per 10 minuti;

5) Lavaggio del DNA e allontanamento dei sali residui: il surnatante è stato allontanato per inversione della provetta ed il *pellet* di DNA è stato lavato con Etanolo al 70 %; il campione è stato poi centrifugato a 15000 rpm per 5 minuti. Il lavaggio con Etanolo 70 % è stato ripetuto per tre volte. È stato poi effettuato un ciclo di lavaggio finale con Etanolo al 100 %;

6) Asciugatura e solubilizzazione del DNA totale estratto: le provette con il *pellet* sono state poste in stufa a 60° C per far evaporare l'etanolo residuo prima di risospingere il pellet in H₂O deionizzata sterile (*Molecular grade DNasi-RNasi, proteasi free*).

8.3 Quantificazione spettrofotometrica del DNA totale

La quantità di DNA è stata valutata attraverso uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), misurando l'assorbanza a 260 nm. Il grado di purezza del DNA è stato valutato in base al rapporto di assorbanza a 260/280 nm ed a 260/230 nm.

8.4 Amplificazione del gene COI e del gene 28SrRNA

8.4.1 COI

Tutti i campioni di DNA estratti in questo studio sono stati inizialmente amplificati utilizzando una coppia di primers universali FFDL (forward) e FRDL2 (reverse)

precedentemente utilizzati da Armani *et al* (2013) per ottenere un frammento di 655 pb del gene *mtCOI* (vedi tabella 8.2 in appendice 2).

Tutti i campioni di DNA sono stati amplificati seguendo il seguente protocollo di PCR: 20 μ L del volume finale di reazione, contenenti 2 μ L di *buffer* 10x (5Prime, Gaithersburg, MD, USA), 200 μ M di ogni dNTP (dNTP mix, Euroclone S.p.A-Life Science Division, Pavia, Italia), 300 nM di primers, 25 ng/ μ L di BSA (Purified BSA 100x, New England BIOLABS Inc, Ipswich, MA, USA), 1,25 U di PerfectTaq DNA Polymerase (5Prime, Gaithersburg, MD, USA), 100 ng di DNA e acqua *DNase free* (Water Mol. Bio. Grade DNasi-RNasi and proteasi free, 5Prime GmbH, Hamburg, Germany), con il seguente programma di amplificazione ciclica: denaturazione a 94° C per 3 minuti; 40 cicli a 94° C per 30 secondi, 51° C per 30 secondi, e 72° C per 35 secondi; estensione finale a 72° C per 5 minuti. I prodotti di PCR (5 μ L) sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2 % confrontando la lunghezza dei frammenti con la scala dell'indicatore Standard SharpMass50-DNA ladder (Euroclone, Wetherby, UK).

I prodotti di PCR sono stati poi purificati con il kit di purificazione Illustra ExoProStar 1-Step Enzymatic PCR and Sequencing Clean-Up (GE Healthcare UK Limited, Amersham Place Little Chalfont Buckinghamshire, UK), secondo la procedura riportata dalle istruzioni. I prodotti purificati sono stati sequenziati da GATC Biotech (Germany). Le sequenze ottenute sono state analizzate usando il programma Clustal W in MEGA versione 5.0. Le sequenze sono state poi corrette manualmente dopo un'analisi visiva.

Il confronto con le altre sequenze disponibili nei *databases* è stato eseguito attraverso un'analisi BLAST sia su GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) che su BOLD (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine). Infine, le sequenze sono state depositate su GenBank via EBI (vedi tabella 8.1 in appendice 2).

8.4.2 28SrRNA

Le sequenze del gene *28SrRNA* appartenente all'Ordine *Rhizostomeae* e *Semaestomeae* ottenute in un precedente studio di Bayha *et al* (2010) sono state scaricate da GenBank e allineate utilizzando Clustal W in MEGA 5.0. La variabilità genetica è stata calcolata utilizzando il test di Kimura 2 (Kimura *et al*, 1980) su un frammento di 1480 pb. Una nuova coppia di primers (F28s e R28s, vedi tabella 8.3 in appendice 2) è stata disegnata per l'amplificazione di un frammento di circa 1600 pb del DNA di *N. nomurai* utilizzando la stessa *mix* di PCR descritta per il gene *COI*, con il seguente programma di amplificazione ciclica: denaturazione a 94° C per 3 minuti; 40 cicli a 94° C per 30 secondi, 51° C per 30 secondi, e 72° C per 35 secondi; estensione finale a 72° C per 10 minuti. I prodotti di PCR sono stati poi purificati, sequenziati ed analizzati come riportato nella sezione 8.4.1. Infine, le

sequenze sono state depositate su GenBank via EBI (vedi tabella 8.1 in appendice 2).

8.5 Disegno dei primers per la PCR Multiplex

8.5.1 Primers specie-specifici aventi come target il gene COI

Le sequenze del gene *mtCOI* appartenente a 24 specie (vedi tabella 9.1 in appendice 3) sono state allineate con Clustal W in MEGA 5.0 successivamente sono stati disegnati due ipotetici primers forward comuni (FJ1 e FJ2, vedi tabella 8.3 in appendice 2) modificando il primer FFDL. I primers reverse sono stati disegnati su regioni ad elevato polimorfismo per l'amplificazione di frammenti di DNA a differente lunghezza (*range* 50-200 pb). Il "primers score" è stato calcolato con il software Beacon designer 7.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) e con il software disponibile su Eurofins MWG Operon alla pagina Web (<http://www.eurofinsgenomics.eu/>). Il numero di *mismatches* tra i reverse primers e la regione di *annealing* delle specie non-target è stata presa in considerazione anche come criterio per la scelta dei primers specie-specifici. In totale, 11 primers, di cui 2 forward e 9 reverse, sono stati sintetizzati mediante Eurofins MWG Operon.

8.5.2 Primers di controllo della PCR aventi come target il gene 28SrRNA

Allo scopo di amplificare in tutte le specie un frammento di controllo di 55 pb insieme al frammento specie-specifico, due primers (28sfor55 e 28srev55, vedi tabella 8.3 in appendice 2) sono stati disegnati su regioni altamente conservate, utilizzando il software Beacon designer 7.0 dopo aver allineato le sequenze del gene *28SrRNA* prodotte dal lavoro precedente di Bayha *et al* (2010) con le sequenze di *N. nomurai* prodotte in questo studio.

8.6 Ottimizzazione della reazione di PCR

I due forward primers sono stati testati sul DNA di tutte le specie di riferimento in singole reazioni con ogni reverse primers disegnato. Sono stati scelti i primers in grado di amplificare la sequenza *target* senza produrre bande aspecifiche (vedi tabella 8.3 in appendice 2).

Tutti i primers sono stati testati in combinazione con la stessa *mix* di reazione della PCR impiegando differenti concentrazioni (da 100 a 400 nM), in presenza di un incremento delle concentrazioni di MgCl₂ (1, 2 e 5 mM) e di nucleotidi (da 200 a 600 μM). Abbiamo testato anche differenti quantità di DNA totale (da 1 a 200 ng) e di Taq polimerasi (1x a 2x). La temperatura ottimale di *annealing* è stata scelta dopo prove in un range tra 47° e 51° C, su termociclature PeqStar 96 Universal Gradient, PEQLAB BiotechnologieGmbH (Euroclone, Wetherby, UK). I primers di controllo della PCR sono stati inizialmente testati su tutti i campioni di DNA di riferimento e poi inclusi nella *multiplex*. Il protocollo di reazione che ha fornito le migliori *performances* di amplificazione è stato testato su 10 campioni di DNA non degradato estratto da 5 CPs e 5 REs per verificare il risultato della metodica Pentaplex in caso di DNA di bassa qualità.

8.7 Protocollo di Pentaplex PCR finale e analisi dei campioni commerciali

In seguito alle prove di ottimizzazione della metodica è stato selezionato il seguente protocollo finale: 10 μ L del volume di reazione contenenti 1 μ L di *buffer* 10x (Fisher Molecular Biology, Trevose PA, USA), 400 Mm di ogni dNTP (dNTP mix, Euroclone S.p.A-Life Sciences Division, Pavia, Italia), 300 nM di FJ2, 200 nM di COT2, 200 nM di RHOP1-1, 225 nM di NEMO1, 200 nM di PEL1, e 100 nM di RHIZ1-1 reverse primers, 100 nM di 28sfor55 e 28srev55 control primers, 25 ng/ μ L di BSA (Purified BSA 100x, New England BIOLABS Inc, Ipswich, MA, USA), 1 U di SubTherm TAQ Polymerase (Fisher Molecular Biology, Trevose, PA, USA), 3 mM di MgCl₂, 50 ng di DNA e acqua *DNase free* con il seguente programma di amplificazione ciclica: denaturazione a 95° C per 3 minuti; 40 cicli a 95° C per 25 secondi, 49° C per 5 secondi, e 72° C per 5 secondi; estensione finale a 72° C per 5 minuti. La verifica dei prodotti della PCR è stata effettuata tramite elettroforesi su gel di agarosio al 4 %. Nel caso del DNA ottenuto dai prodotti commerciali la banda specifica ottenuta con la multiplex PCR è stata comparata con i risultati della analisi BLAST relativa ai campioni effettuata nel precedente studio di Armani *et al* (2013). Lo scopo di questo confronto è stato di valutare l'efficienza e la specificità della metodica anche nel caso di DNA particolarmente degradato.

CAPITOLO 9:

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'identificazione di specie nei prodotti della pesca risulta sempre più importante nell'ambito di un mercato globale. Infatti, numerosi studi, hanno evidenziato che quasi un prodotto della pesca su tre risulta costituito da specie diverse da quelle dichiarate in etichetta (Cawthorn *et al*, 2012; Armani *et al*, 2014). In alcuni casi, questi fenomeni di sostituzione possono raggiungere livelli allarmanti, come nel caso dei prodotti alimentari a base di medusa (Armani *et al*, 2013).

In quest'ottica, le tecniche basate sull'analisi del DNA possono supportare l'attività sia dei laboratori privati che degli organi ufficiali garantendo, attraverso il rispetto delle normative vigenti sulla tracciabilità, la commercializzazione di prodotti sicuri. Tra le metodiche disponibili, la multiplex PCR presenta alcuni vantaggi rispetto alle metodiche basate sul sequenziamento; infatti, la relativa rapidità di esecuzione ed i costi contenuti ne fanno una tecnica particolarmente utile per le analisi di screening routinarie.

9.1 Scelta delle specie e del DNA target

9.1.1 Scelta delle specie

R. esculentum e *N. nomurai* sono le specie asiatiche maggiormente sfruttate per il consumo umano (Hsieh *et al*, 2001; Armani *et al*, 2013).

R. pulmo è stata scelta come *target* della metodica in virtù del fatto che è una delle specie più presenti nel Mar Mediterraneo e nei mari limitrofi (Russel, 1971) A supporto della potenziale utilizzazione di *R. pulmo* come alimento, già suggerita da Muhammed e Sultana (2008); il fatto che sia stata segnalata la presenza di cinesi nell'atto di raccogliere meduse dalla spiaggia o di acquistarle presso pescatori locali (Armani *et al*, 2013). *C. tuberculata* e *P. noctiluca* sono anch'esse ampiamente distribuite nel Mar Mediterraneo (Mariottini *et al*, 2008; Brotz *et al*, 2012). Secondo un articolo pubblicato ne *La Gazzetta del Mezzogiorno* nel 2013 (<http://www.lagazzettadelmezzogiorno.it/notizie-nascoste/meduse-buone-anche-in-cucina-e-contro-l-ipertensione-no619007/>), anche queste specie potrebbero essere utilizzate a scopo alimentare. Inoltre, le analisi molecolari condotte da Armani *et al* (2013) hanno riscontrato la presenza della specie *P. noctiluca* in alcuni prodotti commerciali, etichettati come specie asiatiche.

9.1.2 Scelta del DNA target

La scelta di un *marker* molecolare mitocondriale rispetto ad uno nucleare si basa su numerosi vantaggi tra cui il maggior numero di copie ottenute al termine del processo di

estrazione e la buona resistenza alla degradazione indotta da trattamenti fisico-chimici. Il vantaggio maggiore è dato dall'alto grado di variabilità interspecifica a livello di alcuni geni del DNA mitocondriale che, consente una più facile discriminazione tra specie filogeneticamente anche molto vicine, in questo studio, è stato scelto il gene *COI* per la grande disponibilità di sequenze di riferimento (vedi tabella 9.1 in appendice 3). Inoltre il gene *COI* è stato già in precedenza utilizzato con successo nell'identificazione delle specie edibili di medusa (Armani *et al*, 2013).

9.2 Disegno dei primer

9.2.1 Primers specie-specifici aventi come bersaglio il gene *COI*

Uno dei principali punti da prendere in considerazione durante il disegno dei primers è la natura del campione da analizzare. Infatti, esiste una netta differenza tra il prodotto fresco e quello processato da un punto di vista della qualità del DNA: In particolare, trattamenti con calore e modificazioni del pH rappresentano i principali fattori responsabili della degradazione del DNA negli alimenti (Teletchea *et al*, 2005). In un lavoro precedente condotto da Armani *et al* (2013) è stato rilevato che i prodotti a base di medusa sono caratterizzati da un pH particolarmente basso (circa 4.0 nei prodotti in salamoia e circa 6.0 nei prodotti *Ready to eat*). Malgrado questo è stato comunque possibile ottenere ampliconi di circa 700 pb nel 75 % dei prodotti *Ready to eat* e nel 44 % dei prodotti in salamoia. In ogni caso, sempre nello stesso studio, il 100 % del DNA dei prodotti commerciali è stato comunque amplificato; utilizzando primers in grado di amplificare un frammento corto di 200 pb. Quindi, sulla base di queste evidenze, in questo studio sono stati progettati primers in grado di produrre ampliconi aventi al massimo una lunghezza di 200 pb (vedi tabella 8.3 in appendice 2).

Allo scopo di diminuire l'entità di interazioni aspecifiche tra "DNA *template*" e primers o la formazione di *self*/eterodimeri tra i primers durante l'amplificazione (eventualità che è maggiore nella multiplex PCR rispetto alla uniplex), abbiamo deciso di disegnare un primer forward comune e primers reverse specifici. Tale approccio è stato impiegato con successo per lo sviluppo di altri metodi basati sulla multiplex PCR (Armani *et al*, 2012b; Castigliengo *et al*, 2015).

Considerata l'elevata variabilità del gene *COI*, abbiamo deciso di disegnare un primer forward comune degenerato. Questo è stato disegnato modificando i primers forward progettati da Armani *et al* (2013), mentre i primers reverse sono stati disegnati su regioni polimorfiche del gene *COI*. I reverse primer PEL1 e NEMO1 hanno dimostrato un'alta specificità per le rispettive specie *target* (*P. noctiluca* e *N. Nomurai*), producendo l'amplicone previsto di 165 e 143 pb. Non sono invece state ottenute bande nel caso di campioni di DNA

provenienti da altre specie di medusa appartenenti agli Ordini *Rhizostomeae* e *Semaestomeae*. Per tali motivi i primer reverse PEL1 e NEMO1, sono stati scelti senza dover ricorrere ad ulteriori modifiche, accorgimento che invece è stato necessario nei restanti primers reverse RHIZ1, RHOP1 e COT1. Infatti, il primer reverse RHIZ1 è stato modificato attraverso il cambiamento di una (RHIZ1-1) o più basi (RHIZ1-2) (vedi tabella 8.3 in appendice 2) allo scopo di creare disallineamenti aggiuntivi sulla regione di appaiamento di *R. luteum*. RHIZ1-2 è stato scartato da subito a causa dell'incapacità ad amplificare il DNA di entrambe le specie di *Rhizostoma*, e la scelta è ricaduta sul reverse RHIZ1-1 in virtù della sua specificità ad amplificare unicamente il DNA di *R. pulmo*.

Il primer RHOP1 ha prodotto un amplicone di 101 bp anche dal DNA di *P. benovici*, a causa della presenza di una sola differenza tra le due specie nella zona di aggancio del primer. Per questa ragione, il primer RHOP1 è stato modificato (RHOP1-1) in prossimità della parte terminale 3'. Infatti, disallineamenti in questa zona del primer influenzano la PCR in maniera maggiore rispetto a singoli disallineamenti localizzati internamente nella parte terminale 5' (Lindeman *et al*, 1991). Il nuovo primer RHOP1-1 ha quindi restituito l'amplicone atteso solo in presenza del DNA di *R. esculentum* ed è pertanto stato selezionato. La selettività di amplificazione di questi primers è stata in gran parte incrementata dalle rigorose condizioni adottate nel protocollo di amplificazione (vedi sezione 8.7). Infine, nonostante riuscisse ad amplificare specificamente *C. tuberculata*, il reverse primer COT1 è stato ridisegnato (COT2) per via della scarsa *performance* di amplificazione.

9.2.2 Primer di controllo della PCR aventi come bersaglio il gene 28SrRNA

L'estrazione di DNA contaminato da inibitori è uno dei vari ostacoli alla PCR che si possono avere quando si utilizzano matrici complesse, come quelle alimentari. Infatti, gli inibitori possono interferire con la reazione, portando anche al completo fallimento dell'amplificazione (Teletchea *et al*, 2005). Nel precedente studio di Armani *et al* (2013), è stato evidenziato come gli ioni Al^{3+} possano contribuire al fallimento dell'amplificazione del DNA. e che, nonostante la procedura di pre-estrazione possa ridurre tale concentrazione, risulta tuttavia impossibile prevedere la quantità residua nei campioni di DNA. Dunque, considerato che tale inibizione può comportare la presenza di falsi negativi, abbiamo deciso di introdurre un controllo positivo di reazione disegnando una coppia di primers in grado di amplificare un frammento molto corto di DNA (55 bp).

9.3 PCR Pentaplex: sviluppo e protocollo finale

La presenza di più di una coppia di primer nella reazione incrementa la possibilità di ottenere prodotti d'amplificazione spuri (aspecifici) e può aumentare anche la probabilità di ottenere la formazione di eterodimeri. Allo stesso modo, anche la concentrazione di alcuni

reagenti di PCR può inoltre contribuire ad aumentare la probabilità di tali appaiamenti errati, con la conseguente realizzazione di amplificazioni non specifiche (Markoulatos *et al*, 2002). Per le suddette ragioni il protocollo finale di reazione è stato scelto testando l'impiego di diverse concentrazioni di primers, MgCl₂, nucleotidi, e Taq polimerasi. Allo stesso modo, sono state testati diversi programmi di amplificazione relativamente a tempi e temperature.

9.3.1 Concentrazione di primers e di DNA (template)

Tutti i primers di PCR sono stati utilizzati alla stessa concentrazione durante le prime prove (100 nM). Successivamente, le concentrazioni sono state modificate (mantenendole al di sotto dei 500 nM), allo scopo di ottenere bande con intensità simile. L'introduzione dei primers di controllo (28sfor55; 28srev55) ha ridotto tuttavia l'efficienza di amplificazione di alcuni primers specifici (PEL1 e NEMO1), anche quando utilizzati a basse concentrazioni (50, 100 nM). Per questa ragione le concentrazioni, sia di nucleotidi che di Taq polimerasi, sono state aumentate. Per quanto riguarda il *template*, al fine di ridurre le interazioni aspecifiche soprattutto in caso di DNA degradato proveniente dai campioni commerciali, la nostra concentrazione di lavoro è stata settata su 50 ng.

9.3.2 MgCl₂, nucleotidi e Taq polimerasi

Per testare l'influenza del MgCl₂ sulla reazione sono state fatte diverse prove mantenendo la concentrazione di dNTP costante (200 µM), e incrementando gradualmente il dicloruro di magnesio da 1 a 5 mM le bande hanno acquisito una buona intensità, comparabile fra i vari ampliconi, a 3 mM di MgCl₂: ulteriori incrementi di tale reagente hanno invece comportato un effetto negativo. Successivamente, considerando che nella multiplex PCR più target vengono amplificati simultaneamente e che quindi la quantità di enzimi e nucleotidi può diventare determinante. (Henegariu *et al*, 1997), abbiamo deciso di testare una doppia concentrazione di entrambi i reagenti (400 µM di dNTP e 1U di Taq polimerasi). Questo accorgimento ha apportato un notevole miglioramento all'*output* di amplificazione.

9.3.3 Condizioni di ciclaggio

È evidente che in una metodica di multiplex PCR tutte le coppie di primers utilizzate nella *mix* di reazione dovrebbero garantire un'efficienza simile nell'amplificazione del rispettivo *target*. In questo studio, nonostante i nostri primers abbiano prodotto gli ampliconi attesi in un *range* tra 47-51° C, è stata scelta la temperatura di *annealing* di 49° C. Questa temperatura facilita infatti l'appaiamento del primer degenerato FJ2 e aumenta la specificità dei reverse primers.

9.4 Validazione della Pentaplex PCR utilizzando campioni di DNA di prodotti commerciali a base di medusa

Il protocollo finale di Pentaplex PCR è stato applicato a tutti i campioni di DNA ottenuti da tutti i prodotti commerciali già identificati tramite FINS nello studio Armani *et al*, (2013). In particolare, è stato testato il DNA proveniente da 48 (RE) e 30 (CP). I risultati dell'amplificazione sono stati riportati in tabella 9.3 (vedi appendice 3), mentre le percentuali di successo dell'amplificazione sono riportate in tabella 9.4 (vedi appendice 3). Complessivamente, la metodica è stata in grado di amplificare l'85,4 % del DNA dei prodotti RE; tra questi il 95 % erano campioni dai quali era stato possibile ottenere una sequenza di almeno 658 pb (709 pb, inclusi i primers), mentre la più bassa percentuale è stata ottenuta nel caso di campioni di DNA molto degradati (vedi tabella 9.4 in appendice 3). Nel caso di DNA estratto da prodotti CP, la Pentaplex PCR è stata meno efficace. Nel complesso è stata in grado di amplificare correttamente circa il 60 % dei campioni testati. La minore percentuale di successo dei CP rispetto a RE può essere attribuita alla forte degradazione del DNA di questi prodotti, caratterizzati da valori di pH molto bassi, anziché dall'azione inibitoria dei Sali, come l'alluminio. Infatti, nonostante da questi campioni non siano state ottenute le bande specifiche, è stato comunque sempre visibile l'amplicone di controllo di 55 bp (vedi fig. 9.2 in appendice 3). Inoltre, da ricordare che una bassa differenza (4,7° C) tra MT e AT dei primers potrebbe portare a maggiori difficoltà durante l'appaiamento soprattutto in caso di DNA degradato. Infine, le *multiplex* PCR hanno dimostrato di essere meno sensibili delle *single* PCR (McClatchey *et al*, 2002).

9.5 Etichettatura dei prodotti a base di medusa: problematiche e prospettive

L'etichettatura dei prodotti a base di medusa presenta alcuni problemi relativi alla mancanza di un'armonica regolamentazione commerciale nei mercati occidentali. Infatti, mentre nei Paesi Asiatici tali prodotti vengono suddivisi sulla base di caratteristiche morfologiche in 8 diverse tipologie, negli USA la denominazione commerciale "medusa" è associata alle sole specie appartenenti al genere *Rhopilema*; in Italia, invece, con la denominazione provvisoria "Medusa asiatica", riportata nell'elenco delle denominazioni commerciali del MIPAFF, viene considerata la sola specie *Rhopilema esculentum*. Di fatto, lo studio di Armani *et al* (2013) ha dimostrato un'alta percentuale di *mislabeling* in questi prodotti, mettendo in evidenza come nella maggior parte dei casi venga invece utilizzata la specie asiatica *Nemopilema nomurai* e in alcuni casi di altre specie prettamente mediterranee, quale *Rhizostoma pulmo* o di specie appartenenti a un Ordine diverso da quello delle Rhizostomeae, come *Pelagia noctiluca*. Alla luce di queste considerazioni risulta quindi necessario revisionare le informazioni relative alle denominazioni da riportare in etichetta, ad

esempio, la denominazione “Medusa asiatica” potrebbe essere estesa anche a *N. nomurai*, mentre una nuova denominazione potrebbe comprendere le specie mediterranee, quali *R. pulmo*. Quindi, soprattutto nel caso di *novel food*, l’impiego di una metodica rapida e poco costosa di *screening*, come la multiplex PCR, è fondamentale per la standardizzazione delle procedure di controllo relative all’ispezione, al fine di verificare la veridicità delle informazioni riportate in etichetta e di conseguenza tutelare il consumatore.

CAPITOLO 10:

CONCLUSIONI

La metodica di multiplex PCR sviluppata in questo lavoro si è rivelata un utile test di *screening* per l'identificazione delle 5 specie edibili di medusa (*Rhopilema esculentum*, *Nemopilema nomurai*, *Pelagia noctiluca*, *Rhizostoma pulmo* e *Cotylorhiza tuberculata*), maggiormente sfruttate a scopi alimentari.

In particolare con l'applicazione della Pentaplex PCR è stato possibile amplificare in maniera specifica l'85,4 % dei campioni di DNA di prodotti RE, e circa il 60 % dei campioni di DNA, maggiormente degradati.

Tale analisi rappresenta un valido ausilio per l'identificazione molecolare di prodotti della pesca non convenzionali presenti sul mercato comunitario. Pertanto, è possibile adottare la Pentaplex PCR come strumento analitico di routine da utilizzare per la verifica dell'autenticità delle informazioni riportate in etichetta e garantire la tutela della salute del consumatore.

APPENDICE 1

Tabella 2.1: *Caratteristiche indicative di qualità della medusa processata (Schiariti, 2008)*

Caratteristica	Requisiti di mercato
Elasticità	Il prodotto finito deve essere elastico, resistere ad un leggero stiramento senza rompersi per poi ritornare alla forma originale
Tessitura	È la caratteristica più difficile da ottenere. Le meduse devono essere il più possibile “croccanti”, ma senza perdere l'elasticità
Colore	Le tonalità chiare sono preferite. Le rosse o quelle dorate sono comunque apprezzate
Dimensione	La dimensione è la caratteristica fondamentale per il prezzo del prodotto. Le meduse asiatiche, a seguito del trattamento, presentano una lunghezza di diametro tra 30-50 cm

APPENDICE 2

Tabella 8.1: Campioni di riferimento presi in considerazione per lo sviluppo della Pentaplex PCR (tabella tradotta e adattata da Armani et al, 2013)

Ordine	Famiglia	Genere/Specie	Istituto di Ricerca	Zona di raccolta	Codice sequenza	BLAST (Max identity)	
						BOLD	GenBank
Rihizostomeae	Catostylidae	<i>Catostylus mosaicus</i>	Australian Museum Sydney Australia	Pacifico Sud-occidentale	HF548537	100% <i>C. mosaicus</i>	
				FAO 81	HF548538		
			Sconosciuta	HF548539			
			Pacifico Centro-occidentale	HF968746			
	Cassiopidae	<i>Cassiopea spp.</i>	Department of Chemistry, Biology and Marine Science, Faculty of Science, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan	FAO 71	HF968747	100% <i>C. frondosa</i>	
				Pacifico Nord-occidentale	HF930519		
	Cassiopidae	<i>Cassiopea andromeda</i>	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Buenteweg, Hannover Germany	Sconosciuta	HF930520	100% <i>C. andromeda</i>	
				Oceano Indiano occidentale,	HF930521		
	Cepheidae	<i>Cotylorhiza tuberculata</i>	Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, ICMAN (CSIC) Puerto Real, Cadiz	FAO 51.1	HF930521	100 % <i>C. tuberculata</i>	
				Mar Mediterraneo occidentale	HF930531		
FAO 37-1.1					HF930532		
					HF930533		
					HF930534		
Lychnorhizidae	<i>Lychnorhiza lucerna</i>	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Buenteweg, Hannover Germany	Sconosciuta	LK022700	NS		
				LK022701			
				LK022702			
Lychnorhizidae	<i>Lychnorhiza lucerna</i>	Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil	Oceano Atlantico Sudoccidentale	FAO 41 2.1	HF930522		
					HF968748		
					HF968749		
					HF968750		

macostomeae	Rhizostomati- dae	<i>Rhizostoma pulmo</i>	Armani <i>et al</i> , 2013	Mediterraneo Occidentale FAO 37-1.3	HF968751 HF536559 HF536560 HF536561 HF536562	NS	99% <i>R. pulmo</i>	
			Instituto de Ciencias Marinas de Andalucia, ICMAN (CSIC) Puerto Real, Cadiz	Mediterraneo Occidentale FAO 37-1.1	HF545304 HF545305 HF545306 HF545307 HF545308 HF930513			
		<i>Rhizostoma luteum</i>	Instituto de Ciencias Marinas de Andalucia, ICMAN (CSIC) Puerto Real, Cadiz	Atlantico Nord-orientale FAO 27, Subarea IX.a	HF937340 HF937341 HF545309	NS		
		<i>Nemopilema nomurai</i>	Japan Sea National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, Niigata, Japan	Pacifico Nord-occidentale FAO 61	HF536563 HF536564 HF536565 HF536566 HF536567 HF536568 HF536569 HF536570	99-100% <i>N. nomurai</i>		
		<i>Rhopilema esculentum</i>	Ocean University of China. Fisheries of College. Qingdao, China This study	Pacifico Nord-occidentale FAO 61	HF536571 HF536572 HF536573 HF536574 HF930514 HF930515	NS	99-100% <i>R. esculentum</i>	
		<i>Rhopilema nomadica</i>	Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Japan					
			Israel Oceanographic and Limnological Research National Center for Mariculture Eilat, Israel	Mediterraneo Occidentale FAO 37-3.2	HF930516	NS	99% <i>R. nomadica</i>	
			Department of Marine Biology, University of Haifa, Israel		HF930517 HF930518			
		Cyaneidae	<i>Cyanea lamarckii</i>	Institute of Coastal Research Marine Bioanalytical Chemistry	Atlantico Nord-orientale FAO 27 Div. Iva	HF930523 HF930524 HF930525 HF930526	100% <i>C. lamarckii</i>	NS <i>C. capillata</i>
			<i>Cyanea capillata</i>	Geesthacht, Germany			99-100%	
		Pelagidae	<i>Pelagia noctiluca</i>	Dipartimento di Biologia, Università di Genova,	Mediterraneo Occidentale	HF930527	NS	99-100%

		Genova	FAO 37-1.3	HF930528	<i>P. noctiluca</i>
		This study		HF930529	
		Institute of Sciences of Food Production of the National Research Council, Lecce, Italy	Mediterraneo Occidentale FAO 37-.2.1	HF930530	
				LK022705	
				LK022706	
				LK022707	
				LK022708	
Ulmaridae	<i>Aurelia aurita</i>	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ITZ, Ecology and Evolution Buenteweg, Hannover Germany	Pacifico Nord-occidentale FAO 61	HF968752	99% <i>A. aurita</i>
	<i>Aurelia sp.1</i>	Institute of Sciences of Food Production of the National Research Council, Lecce, Italy	Mediterraneo occidentale FAO 37-.2.1	LK022703 LK022704	100% <i>Aurelia sp.1</i>

Tabella 8.2: Coppia di primers universali FFDL (forward) e FRDL2 (reverse) (tabella tradotta e adattata da Armani et al, 2013)

Codice primer	Bibliografia	Sequenza primer (5'- 3')	PL (pb)	TM (° C)
FFDL	Armani et al, 2013	TTTCAACTAACCA YAAAGAYATWGG	25	56,4
FRDL2	Armani et al, 2013	TANACTTCWGGRTGNCCRAAGAATCA	26	61,6

PL= lunghezza primer; TM= temperatura di melting.

Tabella 8.3: Disegno dei primers per lo sviluppo della Pentaplex PCR (tabella tradotta e adattata da Armani et al, 2014)

Codice primer	Sequenza 5'- 3'	bp	MT (° C)	AL
FJ1	CAAACCATAAAGAYATWGG	19	49,1	203
FJ2	CAAACCATAAAGAYATTGGWAC	22	53,7	
RHIZ1	ACCTCCTATCAACACTG	17	50,4	
RHIZ1-1	ACGTCCTATCAACACTG	17	50,4	
RHIZ1-2	ACGTCGTATCAACACTG	17	50,4	
PEL1	TTATTAGGGCGTGAGC	16	49,2	165
NEMO1	AACTACGTTATAAAGTTGG	19	50,2	143
RHOP1	ACCTGATAGTTCTAATCTA	19	48	101
RHOP1-1	ACGCGATAGTTCTAATCTA	19	50,2	
COT1	GCCGGCACCTATAATT	16	49,2	68
COT2	GGCACCTATAATTCCG	16	49,2	72
28sfor55	TGGTTACAACGGGTGA	16	49,2	55
28srev55	TCTCAGGCTCCCTCT	15	50,6	
F28s	ACTGTGAAACTGCGAATG	18	52,4	1598
R28s	CCATTCAATCGGTAGTAGC	19	51,1	

bp= paia basi; MT= temperatura di melting; AL= lunghezza amplicone

APPENDICE 3

Tabella 9.1: Sequenze di riferimento utilizzate per il disegno dei primers per lo sviluppo della Penta-plex PCR (tabella tradotta e adattata da Armani et al, 2014)

Specie	Sequenze	
	Numero	Codice accesso
<i>Aurelia aurita</i>	40	AY903093-95; AY903117-18; AY903208-12; HF968752 ; JQ353726-28; JQ623914; JX995329; KC311384-85; KC440127; KC789074-93
<i>Cassiopea Andromeda</i>	24	AB563739-40; AY319448-62; AY319471-73; AY331593-95; HF930521
<i>Cassiopea frondosa</i>	5	AY319467; AY319469-70; HF930515; HF930520
<i>Cassiopea xamachana</i>	5	AY319463-66; AY319468
<i>Catostylus mosaicus</i>	70	AY319476; AY737184-247; HF548537-39 ; HF968746-47
<i>Cotylorhiza tuberculata</i>	5	HF930531-35
<i>Crambionella orsini</i>	2	EU363343-44
<i>Cyanea annaskala</i>	7	AY902912-17; AY902923
<i>Cyanea capillata</i>	21	AY902911; AY902924; HF930525-26; JX995329-46
<i>Cyanea lamarckii</i>	14	JX995347-57; JX995360-62
<i>Cyanea rosea</i>	5	AY902918-22
<i>Drymonema dalmatinum</i>	5	HQ234614-17; HQ234621
<i>Drymonema larsoni</i>	9	HQ234610-13; HQ234618-20; HQ234622; HQ234650
<i>Lychnorhiza lucerna</i>	5	HF930522 ; HF968748-51
<i>Mastigias sp.</i>	132	AY902925-99; AY903000-51; EU363340; JN215543-46
<i>Nemophilema nomurai</i>	15	AB243416; EU373728; GU145135; HF536563-70 ; HM045296; JX845348; JQ353746-47
<i>Pelagia noctiluca</i>	183	GQ120093-96; GQ375903-6025; HE591457; HF930527-

		30 ; HM358383-403; JQ697960-74; JX235428-42
<i>Phyllorhiza punctate</i>	3	EU363341-42; GQ120101
<i>Rhizostoma luteum</i>	3	HF937340-41 ; HF545309
<i>Rhizostoma octopus</i>	63	HQ425417-79
<i>Rhizostoma pulmo</i>	24	GQ999568-71; HF536559-62 ; HF545304-08 ; HF930513 ; HG931669; HQ902114-22
<i>Rhopilema esculentum</i>	12	EU373722-24; HF536571-74 ; HF930514-15 ; JQ353756-57; JX845347
<i>Rhopilema nomadica</i>	5	JN378391; HG931668; HF930516-18

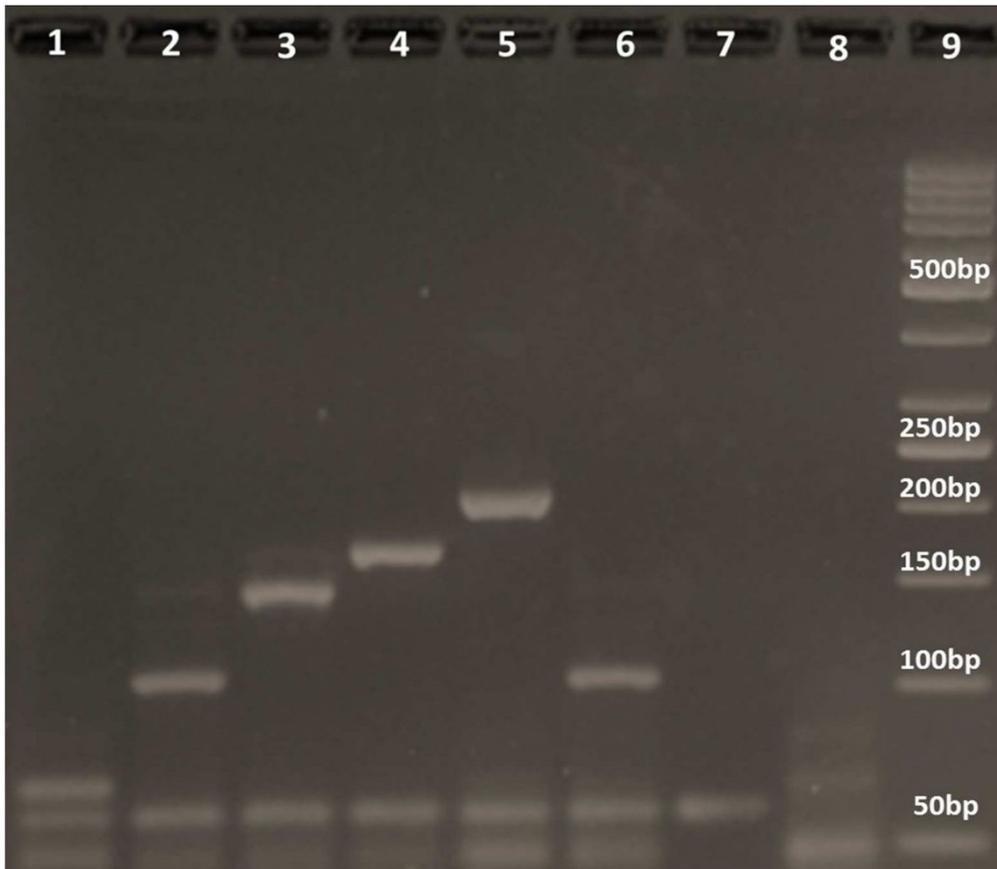


Fig. 9.2: Elettroforesi su gel di agarosio (4 %) delle 5 specie di medusa scelte come target dopo la Pentaplex PCR. Corsia 1, *C. tuberculata* (72 bp); corsia 2, *R. esculentum* (101 bp); corsia 3, *N. nomurai* (143 bp); corsia 4, *P. noctiluca* (165 bp); corsia 5, *R. pulmo* (203 bp); corsia 6, DNA da prodotti RE; corsia 7, DNA da prodotti CP; corsia 8, H₂O; DNA ladder band size: 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 100 bp, 50 bp (Armani et al, 2014)

Tabella 9.3: Campioni RE e CP provenienti da market, precedentemente identificati ed utilizzati in questo studio per la validazione della Pentaplex PCR (tabella tradotta e adattata da Armani et al, 2013)

Campioni	Città e luogo di raccolta	Lunghezza sequenza e codice	BLAST (max identity)		Risultati Pentaplex PCR
			Bold	Genbank	
RE-2	Prato/M	658, HF930536	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-3	Prato/M	658, HF930537	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-5	Milano/M	658, HF930538	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-6	Milano/M	658, HF930539	99 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-8	Prato/M	658, HF930540	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-9	Prato/M	658, HF930541	99 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-10	Firenze/M	658, HF930542	99 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-11	Roma/M	658, HF930543	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-12	Roma/M	658, HF930544	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-13	Roma/M	658, HF930545	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-14	Roma/R	658, HF930546	NM	100 % R. <i>esculentum</i>	X 101 bp
RE-15	Roma/M	658, HF930547	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-19	Roma/M	658, HF930548	99 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-21	Firenze/M	658, HF930549	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-24	Firenze7R	658, HF930550	NM	100 % R. <i>esculentum</i>	X 101 bp
RE-27	Milano/M	658, HF930551	99 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-40	Prato/M	658, HF937280	99 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-43	Prato/R	658, HF937281	99 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-44	Prato/R	658, HF937282	NM	100 % R. <i>esculentum</i>	X 101 bp
RE-48	Firenze/M	658, HF937283	100 % N. <i>nomurai</i>		X 143 bp
RE-28	Milano/M	206, HF937294	100 %		X 143 bp

			<i>N. nomurai</i>		
RE-29	Milano/M	206, HF937295	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-34	Prato/M	206, HF937296	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-38	Prato/M	206, HF937297	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-39	Prato/M	206, HF937298	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-41	Prato/M	206, HF937299	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-42	Prato/M	206, HF937300	100 % <i>N. nomurai</i>		NB
RE-45	Firenze/M	206, HF937301	100 % <i>N. nomurai</i>		NB
RE-46	Firenze/M	206, HF937302	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-47	Firenze/M	206, HF937303	99 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-4	Prato/M	206, HF937288	100 % <i>N. nomurai</i>		NB
RE-16	Roma/M	206, HF937289	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-20	Firenze/M	206, HF937290	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-22	Firenze/M	206, HF937291	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-23	Firenze/M	206, HF937292	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-26	Prato/M	206, HF937293	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-30	Milano/M	206, HF937318	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-31	Milano/M	206, HF937319	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-32	Prato/M	206, HF937320	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-33	Prato/M	206, HF937321	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-35	Prato/M	206, HF937322	100 % <i>N.</i>		NB

			<i>nomurai</i>		
RE-36	Prato/M	206, HF937323	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-37	Prato/M	206, HF937324	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-1	Prato/M	206, HF937313	100 % <i>N. nomurai</i>		NB
RE-7	Milano/M	206, HF937314	100 % <i>N. nomurai</i>		NB
RE-17	Roma/M	206, HF937315	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-18	Roma/M	206, HF937316	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
RE-25	Prato/M	206, HF937317	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
CP-7	Prato/M	658, HF937284	99 % <i>N. nomurai</i>		NB
CP-8	Prato/M	658, HF937285	100 % <i>N. nomurai</i>		143 bp
CP-24	Zhejiang(PRC)/M	658, HF937287	NM	100 % <i>R. esculentum</i>	101 bp
CP-13	Roma/M	658, HF937286	NM	99 % <i>R. pulmo</i>	203 bp
CP-30	Jangsu (PRC)/M	658, XX	99 % <i>N. nomurai</i>		143 bp
CP-10	Firenze/M	206, HF937305	100 % <i>N. nomurai</i>		NB
CP-9	Prato/M	206, HF937304	NM	100 % <i>R. esculentum</i>	NB
CP-11	Roma/M	206, HF937306	NM	100 % <i>R. esculentum</i>	X 101 bp
CP-15	Roma/M	206, HF937308	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
CP-12	Roma/M	206, HF937307	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
CP-18	Firenze/M	206, HF937309	99 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
CP-21	Prato/M	206, HF937310	NM	86 % <i>R. nomadica</i>	NB
CP-27	Zhejiang (PRC)/M	206, HF937311	NM	100 % <i>P. noctiluca</i>	X 165 bp
CP-28	Zhejiang (PRC)/M	206, HF937312	NM	100 % <i>P. noctiluca</i>	NB
CP-1	Prato/M	145, HF937325	NM	100 % <i>R. esculentum</i>	X 101 bp
CP-2	Prato/M	145, HF937326	NM	100 % <i>R. pulmo</i>	X 203 bp
CP-3	Prato/M	145, HF937327	99 % <i>N. nomurai</i>		NB

CP-4	Prato/M	145, HF937328	99 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
CP-5	Prato/M	145, HF937329	NM	100 % <i>R. esculentum</i>	NB
CP-6	Prato/M	145, HF937330	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
CP-14	Roma/M	145, HF937331	NM	100 % <i>P. noctiluca</i>	NB
CP-16	Roma/M	145, HF937332	NM	100 % <i>P. noctiluca</i>	NB
CP-17	Roma/M	145, HF937333	NM	100 % <i>R. esculentum</i>	X 101 bp
CP-19	Prato/M	145, HF937334	100 % <i>N. nomurai</i>		X 143 bp
CP-20	Prato/M	145, HF937335	NM	85 % <i>C. stuhlmanni</i>	X NB
CP-22	Prato/M	145, HF937336	NM	85 % <i>C. stuhlmanni</i>	X NB
CP-23	Zhejiang (PRC)/M	145, HF937337	NM	100 % <i>P. noctiluca</i>	NB
CP-25	Zhejiang (PRC)/M	145, HF937338	NM	100 % <i>P. noctiluca</i>	X 165 bp
CP-26	Zhejiang (PRC)/M	145, HF937339	NM	100 % <i>P. noctiluca</i>	NB
CP-29	Jangsu (PRC)/M	145, XX	NM	100 % <i>R. esculentum</i>	X 101 bp

Tabella 9.4: Percentuale di amplificazione del DNA estratto dai campioni RE e CP utilizzati nella Pentaplex PCR (tabella tradotta e adattata da Armani et al, 2014)

	Lunghezza sequenza (con primers)							
	709 pb		256 pb		193 pb		Totale	
	RE	CP	RE	CP	RE	CP	RE	CP
Campioni testati	20	5	16	9	12	16	48	30
Campioni positivi	19	4	13	5	9	8	41	17
Percentuale di campioni positivi	95 %	80 %	81 %	55,5 %	75 %	37,5 %	85,4%	57 %

BIBLIOGRAFIA

1. AA.VV. (2009): Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria-attività di pesca.
2. Abed-Navandi, D., Kikinger, R. (2007): *First record of the tropical scyphomedusa Phyllorhiza punctate von Lendenfeld, 1884 (Cnidaria: Rhizostomeae) in the Central Mediterranean Sea*. Aquatic Invasions 2:391-394;
3. Accum, F. (1820): *A treatise on adulteration of food, and culinary poisons*. London;
4. Agassiz, L. (1862): *Contributions to the Natural History of the United States of America*. Vol. IV, pt. III. Discophorae. pt. IV. Hydroidae. pt. V. Homologies of the Radiata. Boston, London, little, Brown; Trubner, pp. 1-360;
5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. Walter, P. (2002): *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science;
6. Arai, N. A. (1997): *A functional biology of scyphozoa*. London, Ed. Chapman & Hall, 1997;
7. Arcangeli, G., Baldrati, G., Pirazzoli, P. (2003): *La trasformazione dei prodotti della pesca: tecnologia, controllo e igiene di lavorazione*. SSICA Stazione sperimentale per l'industria delle conserve alimentari.
8. Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2011): *Molecular characterization of icefish, (Salangidae family), using direct sequencing of mitochondrial cytochrome b gene*. Food Control, 22(6), 888-895.
9. Armani, A., D'Amico, P., Castigliero, L., Sheng, G., Gianfaldoni, D., Guidi A. (2012a): *Mislabeling of an "unlabelable" seafood sold on the European market: The jellyfish*. Food Control 26:247-251;
10. Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2012b): *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 133(1);
11. Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gandini, G., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2012c). *A rapid PCR-RFLP method for the identification of *Lophius* species*. European Food Research and Technology, 235, 253–263.
12. Armani, A., Castigliero, L., Guidi, A. (2012d): *Review: Fish frauds: the DNA challenge*. CAB reviews 2012 7 n. 71;
13. Armani, A.; Tinacci, L.; Giusti, A.; Castigliero, L.; Gianfaldoni, D.; Guidi, A. (2013):

- What is inside the jar? Forensically informative nucleotide sequencing (FINS) of a short mitochondrial COI gene fragment reveals a high percentage of mislabeling in jellyfish food products.* Food Res. Int., 54, 1383-1393;
14. Armani, A.; Tinacci, L.; Xiong, X.; Titarenko, E.; Guidi, A.; Castigliego, L. (2014b): *Development of a simple and cost-effective bead-milling method for DNA extraction from fish muscles.* Food Anal. Methods, 7 (4), 946–955.
 15. Armani, A., Guardone, L., Castigliego, L., D'Amico, P., Messina, A., Malandra, R., Guidi, A. (2014): *DNA and Mini-DNA Barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market.* Food Control, 50, 589-596;
 16. Asensio Gil, L. (2007): *PCR - based methods for fish and fishery products authentication.* Trends in Food Science & Technology, 18(11), 558-566;
 17. Barbuto, M.; Galimberti, A.; Ferri, E.; Labra, M.; Malandra, R.; Galli, P.; Casiraghi, M. (2010): *DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (Mustelus spp.).* Food Res. Int., 43, 376–381.
 18. Barlett, S., Davidson, W. (1991): *FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure to identifying the animal origin of biological specimens.* Biotechnology 12:408-411;
 19. Bauer, T., Weller, P., Hammes, W.P., Hertel, C. (2003): *The effect of processing parameters on DNA degradation in food.* European Food Research Technology 217:338-343;
 20. Bayha, K. M.; Dawson, M.; Collins, A. G.; Barbeitos, M. S.; Haddock, S. H. (2010): *Evolutionary relationship among Scyphozoan jellyfish families based on complete taxon sampling and phylogenetic analyses of 18s and 28s ribosomal DNA.* Integr. Comp. Biol., 50 (3), 436– 455;
 21. Benovic, A. (1984): *Appearance of the jellyfish Pelagia noctiluca in the Adriatic Sea during the summer season oh 1983.* Workshop on Jellyfish in the Mediterranean, Athens, Greece, 31 October-4 November 1983; UNEP: Athens, 1991. pp. 202-211;
 22. Bergamo, E., Moriconi, S. (2012): *La valutazione del rischio nella catena alimentare. Attività e organizzazione dell’EFSA - ruolo e interazione del Ministero della Salute – ruolo del Focal Point nazionale, Roma 27 Sett. 2012,*
www.salute.gov.it/imgs/C_17_notizie_690_listaFile_itemName6_file.pdf ;
 23. Bernardi, C., Colombo, F., Balzaretto, C., Gagliardi, C., Cattaneo, P. (2011): *DNA barcoding: a useful tool for food inspection.* Italian Journal of Food Safety,1(1), 7-10.
 24. Berrini, A., Tepedino, V., Borromeo, V., Secchi, C. (2006): *Identification of freshwater*

- fishcommercially labelled “perch” by isoelectric focusing and two-dimensional electrophoresis. Food Chemistry 96: 163-168;*
25. Bingel, F., Avsar, D., Gucu, A.C. (1991): *Occurrence of jellyfish in Mersin Bay. Jellyfish blooms in the Mediterranean. Proceedings of the II Workshop on Jellyfish in the Mediterranean Sea. MAP Technical Reports Series, N. 47. UNEP: Athens, 1991. pp. 65-71;*
 26. Bottero, M. T., Dalmaso, A. (2011): *Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. The Veterinary Journal, 190(1), 34-38;*
 27. Botton, Toby F. & William M. Graham. (2004): *Morphological variation among populations of an invasive jellyfish. Marine ecology. Progress series 278: 125-139.*
 28. Brotz, L. (2011): *Are jellyfish the food of the future? INFOFISHInternational4/2011 (Online) www.seararoundus.org/magazines/2011/INFOFISHInternational_AreJellyfishTheFoodOfTheFuture.pdf;*
 29. Brotz, L.; Pauly, D. (2012): *Jellyfish populations in Mediterranean Sea. Acta Adriac. 2012, 53 (2), 213–232;*
 30. Brown, W. M., George, M. Jr, Wilson, A.C. (1979): *Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Procl. Nat. Acad. Sci. USA*
 31. Busato, S. (2010): *Frodi alimentari per sostituzione di specie: identificazione di specie mediante tecnica Pyrosequencing. Tesi di laurea in biotecnologie per l'alimentazione, Università di Padova;*
 32. Campagna, M. C., Tepedino, V., Di Domenico, E., Saccares, S., Cavallina, R. (2008): *Identificazione di specie nel settore ittico. Rivista Di Scienza Dell Alimentazione, 37(1), 29;*
 33. Capatti, A., De Bernardi, A., Varni, A. (1998): *Storia d'Italia, L'Alimentazione. Annali 13 Einaudi, Torino;*
 34. Castigliero, L., Vallone, L., Armani, A., Marzano, M.A., Li, X.N., Fanzone, F., Fusco, S., Facibeni, E., Dragoni, I., Gianfaldoni, D., Guidi, A. (2009): *Microbiological survey on jellyfish food products: preliminary results. Italian Journal of Food Safety, September 2009, Issue 5;*
 35. Castigliero, L.; Armani, A.; Tinacci, L.; Gianfaldoni, D.; Guidi, A. (2015): *Two alternative multiplex PCRs for the identification of the seven species of anglerfish (Lophius spp.) using an end-point or a melting curve analysis real-time protocol. Food Chem, 166 (1), 1–9;*
 36. Catanese, G., Manchado, M., Fernández-Trujillo, A., Infante, C. (2010): *A multiplex- PCR*

- assay for the authentication of mackerels of the genus Scomber in processed fish products.* Food chemistry, 122(1), 319-326;
37. Cawthorn, D.M., Steinman, H.A., Witthuhn, R.C. (2012): *DNA barcoding reveals a high incidence of fish species misrepresentation and substitution on the South African market.* Food Research International, 46(1), 30-40;
 38. Chapela, M. J., Sotelo, C. G., Pérez-Martín, R. I., Pardo, M. Á., Pérez-Villareal, B., Gilardi, P., Riese, J. (2007): *Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification.* Food Control, 18(10), 1211-1215;
 39. Chen, T. Y., Shiau, C. Y., Noguchi, T., Wei, C. I., Hwang, D. F. (2003): *Identification of puffer fish species by native isoelectric focusing technique.* Food chemistry, 83(3), 475-479.
 40. Chiappini, M. (2003). *Problematiche sanitarie nel settore ittico. Criteri di freschezza.* Il Pesce, 3: 81-87;
 41. Civera, T. (2003): *Species identification and safety of fish products.* Veterinary research communications, 27, 481-489;
 42. Civera, T., Bottero, M.T. (2007): *La rintracciabilità nei prodotti della pesca. L'approccio molecolare.* Atti XVII Convegno AIVI, Cesenatico 14-16 giugno, pp. 50-57;
 43. Codice Penale, Libro II, Titolo VI, Capo II. *Dei delitti di comune pericolo mediante frode.* (art. 439, 440, 442, 444). Lattanzi, Lupo. Giuffrè Editore (2010)
 44. Colavita G. (2012): *Le frodi alimentari tra storia e attualità.* In: Colavita G., Meazza M., Rea S., Nasali M. Frodi alimentari, tecniche ispettive, aspetti tecnici e giuridici. Le Point Vétérinaire Italie.
 45. Costello, J.H., Colin, S.P. (1995): *Flow and feeding by swimming scyphomedusae.* Marine Biology 124:399-406;
 46. Cutarelli, A., Amoroso, M. G., De Roma, A., Girardi, S., Galiero, G., Guarino, A., Corrado, F. (2014): *Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing.* Food Control, 37, 46-50.
 47. Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G. R., Thorpe, R. S. (2007): *Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification.* Forensic Science International, 173(1), 1-6;
 48. Dawson, M. N.; Jacobs, D. K. (2001): *Molecular evidence for cryptic species of Aurelia aurita (Cnidaria, Scyphozoa).* Biol, Bull., 200, 92-96;
 49. Dawson, M.N. (2005): *Incipient speciation of Catostylus mosaicus (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-*

- east Australia*. Journal of Biogeography, Volume 32, Issue 3, pp. 515-533, March, 2005;
50. Dong, Z., Dongyan, L., Keesing, J.K. (2010): *Jellyfish blooms in China: Dominant species, causes and consequences*. Marine Pollution Bulletin 60:954-963;
 51. EFSA, 2008: *Safety of aluminium from dietary intake. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC)*. The EFSA Journal 754:1-34;
 52. Espineira, M., González-Lavín, N., Vieites, J. M., Santaclara, F. J. (2008): *Authentication of Anglerfish Species (Lophius spp) by Means of Polymerase Chain Reaction– Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR– RFLP) and Forensically Informative Nucleotide Sequencing (FINS) Methodologies*. Journal of agricultural and food chemistry, 56(22), 10594-10599;
 53. FAO. (2014): *The state of world fisheries and aquaculture production*. (On-line) www.fao.org/3/a-i3720e.pdf;
 54. Fewkes, J.W. (1887): *A new rhizostomatous medusa from New England*. American Journal of Science, Ser.3, 33:119-125;
 55. FDA (2014): *The seafood list*. (On-line) <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=seafoodlist>
 56. FDA & EPA (2004): *Revised consumer advisory on methylmercury in fish*. (On-line) <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2004/ucm108267.htm>
 57. Focà, A., Lamberti, A.G. (2003): *Metodiche estrattive per la preparazione dei campioni*. Roche_Diagnostics pubblicazioni, EsaDia 13:50-53;
 58. Fossette, S., Gleiss, A. C., Chalumeau, J., Bastian, T., Armstrong, C. D., Vandenabeele, S & Hays, G. C. (2015): *Current-oriented swimming by jellyfish and its role in bloom maintenance*. Current Biology, 25(3), 342-347.
 59. Franqueville, C. (1971): *Macroplancton profond (invertébrés) de la Méditerranée nord-occidentale*. Tethys 3:11-56;
 60. Fuentes, V., Straehler-Pohl, I., Atienza, D., Franco, I., Tilves, U., Gentile, M., Acevedo, M., Olariaga, A., Gili, J.M. (2011): *Life cycle of the jellyfish Rhizostoma pulmo (Scyphozoa: Rhizostomeae) and its distribution, seasonality and inter-annual variability along the Catalan coast and the Mar Menor (Spain, NW Mediterranean)*. Marine Biology 158(10):2247-2266;
 61. Galil, B.S., Spanier, E., Ferguson, W.W. (1990): *The scyphomedusae of the Mediterranean coast of Israel, including two Lessepsian migrants new to the Mediterranean*. Zoologische Mededelingen (Leiden) 64:95-105;

62. Gao, S., Hong, H., Zhang, S. (2002): *Fauna Sinica Invertebrata 27. Phylum Cnidaria, Class Hydrozoa, Subclass Siphonophorae, Class Scyphomedusae*. Science Press, Beijing, pp. 272 (in Chinese);
63. Giordano, R. Costantini, S. (1993). *Some aspects related to the presence of aluminium in waters*. Ann. Ist. Super. Sanità 29 (2):305-311;
64. Graham, W.M., Martin, D.L., Felder, D.L., Asper, V.L., Perry, H.M. (2003): *Ecological and economic implications of a tropical jellyfish invader in the Gulf of Mexico*. Biological Invasions 5:53-69. doi: 10.1023/A:1024046707234;
65. Griffin, B.D., Murphy, T. (2011): *Cannonball jellyfish: Stomolophus meleagris*. Disponibile On-line: <https://www.dnr.sc.gov/cwcs/pdf/Cannonballjellyfish.pdf>;
66. Guidi, A., Castigliero, L., Armani, A. (2008): *Diagnostica analitica degli alimenti*. In Colavita G. Igiene e Tecnologie degli alimenti di origine animale. Point Veterinarie, Italia, Milano;
67. Hajibabaei M, Smith A, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield J.B, Hebert PD (2006): *A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded*. Molecular Ecology Notes 2006;
68. Hale, G. (1999): *The Classification and Distribution of the Class Scyphozoa*. (On-line) <http://gladstone.uoregon.edu/~ghale/pdf/scyphozoa.pdf>;
69. Hamza, A. (1990): *Sur la prolifération des méduses sur certaines cotes Tunisiennes*. Rapp. Doc. Inst. Nat. Sc. Tech. Océanogr. Peche Salambo 3:1-9;
70. Hebert, P. D., Ratnasingham, S., de Waard, J. R. (2003): *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270(Suppl 1), S96-S99.
71. Hemmer, W. (2002): *Food derived from genetically modified organisms and detection methods*. BATS report 2/97, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss Science Foundation, Basel, Switzerland, 2002;
72. Henegariu, O.; Heerema, N. A.; Dlouhy, S. R.; Vance, G. H.; Vogt, P. H. (1997): *Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol*. Biotechniques, 23 (3), 504-511;
73. Henroth, L., Groendahl, F. (1985): *On the biology of A. aurita. Predation by Coryphella verrucosa (Gatropoda, Opisthobranchia), a major factor regulating the development of Aurelia populations in the Gullmar Fjord, western Sweden*. Ophelia 24:37- 45;
74. Herut, B., Galil, B.S. (2000): *The coast of Israel, southeast Mediterranean*. Sheppard, C.R.C. (Ed)(2000). Seas at the millennium: an environmental evaluation: 1 Regional

- chapters: Europe, The Americas and West Africa. pp. 253-265;
75. Hickman, C.P.Jr, Roberts, L.S., Larson, A. (2001): *Integrated principles of zoology, eleventh edition*. New York, Ed. McGraw-Hill Companies, Inc., 2001(2nd edition);
 76. Holst, S.; Sotje, I.; Tiemann, H.; Jarms, G. (2007): *Life cycle of the rhizostome jellyfish *Rhizostoma octopus* (L.) (Scyphozoa, Rhizostomeae), with studies on cnidocysts and statoliths*. Mar. Biol., 151, 1695-1710;
 77. Hong, H., Zhang, S., Wang, C. (1978): *Hai tsue (edible jellyfish)*. Science Publications, Beijing, 70 pp. (in Chinese);
 78. Hsieh, Y.P., Rudloe, J. (1994): *Potential of utilizing jellyfish as food in Western countries*. Trends in Food Science and Technology 5(7):225-229;
 79. Hsieh, Y.P., Leong, F.M., Barnes, K.W. (1996): *Inorganic constituents in fresh and processed cannonball jellyfish (*Stomolophus meleagris*)*. J. Agric. Food. Chem. 44:3117-3119;
 80. Hsieh, Y.P., Leong, F.M., Rudloe, J. (2001): *Jellyfish as food*. Hydrobiologia 451 (Dev. Hydrobiol. 155):11-17;
 81. Hubalkova, Z., Kralik, P., Tremlova, B., Rencova, E. (2007): *Methods of gadoid fish species identification in food and their economic impact in the Czech Republic: a review*. Veterinarni Medicina-Praha-, 52(7), 273;
 82. Ishizaki, S., Yokoyama, Y., Oshiro, N., Teruya, N., Nagashima, Y., Shiomi, K., Watabe, S. (2006): *Molecular identification of pufferfish species using PCR amplification and restriction analysis of a segment of the 16S rRNA gene*. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 1(1), 139-144;
 83. Jacquet, J.L., Pauly, D. (2007): *The rise of seafood awareness campaigns in an era of collapsing fisheries*. Marine Policy, 31 (3), 308-313;
 84. Jacquet, J.L., Pauly, D. (2008): *Trade secrets: renaming and mislabelling of seafood*. Marine Policy 32(3):309-318;
 85. Kawahara, M., Uye, S.I., Ohtsu, K., Lizumi, H. (2006): *Unusual population explosion of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae) in East Asian waters*. Marine Ecology Progress Series 307:161-173;
 86. Kimura, M. A. (1980): *Simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. J. Mol. Evol., 16, 111–120;
 87. Kishinuoye, K. (1891): *Bizen kurage. *Rhopilema esculenta**. Dobutsugaku Zasshi, Tokyo 3(28):53 (in Japanese);

88. Kishinuoye, K. (1922): *Echizen kurage, Nemopilema nomurai*. Dobutsugaku Zasshi, Tokyo 34:343-346 (in Japanese);
89. Kitamura, M., Omori, M. (2010): *Synopsis of edible jellyfishes collected from Southeast Asia, with notes on jellyfish fisheries*. Plankton Benthos Res 5(3): 106-118, 2010;
90. Knuutinen, J., Harjula, P. (1998): *Identification of fish species by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 705(1), 11-21;
91. Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, *et al.*(1989): *Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 1989.
92. Kochzius, M., Seidel, C., Antoniou, A., Botla, S. K., Campo, D., Cariani, A., Blohm, D. (2010): *Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays*. PLoS One, 5(9), e12620;
93. Kramp, P. L. (1961): *Synopsis of the medusae of the world*. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 40, 469.
94. Kwetegyeka, J., Mpango, G., Grahl-Nielsen, O. (2008): *Variation in fatty acid composition in muscle and heart tissues among species and populations of tropical fish in Lakes Victoria and Kyoga*. Lipids, 43(11), 1017-1029.
95. Lantz, P.G., Al-Soud, W.A., Knutsson, R., Hahn-Hagerdal, B., Radstrom, P. (2000): *Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples*. Biotechnology Annual Review 5:87-130;
96. Lehane, L., Lewis, R.J. (2000) *Ciguatera: recent advances but the risk remains*. International Journal of Food Microbiology, 61(2), 91-125;
97. Lenstra, J. A., Lees, M. (2003): *DNA methods for identifying plant and animal species in food*. Food authenticity and traceability, 34-53;
98. Li, J.R., Hsieh, Y-H. P. (2004): *Traditional Chinese food technology and cuisine*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 13(2):147-155;
99. Lindahl, T., Nyberg, B. (1972): *Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid*. Biochemistry 11(19):3610-3618;
100. Lindeman, R.; Hu, S. P.; Volpato, F.; Trent, R. J. (1991): *PCR mutagenesis enabling rapid non-radioactive detection of common β - thalassemia mutations in Mediterraneans*. Br. J. Haematol., 78, 100-4;
101. Ling K.H., Nichols P.D., But P.P.H. (2009): *Fish-induced keriorrhea*. In: Taylor S.L. (ed.): *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol. 57. Elsevier B.V.: 1-52.

102. Lockley, A.K., Bardsley, R. G. (2000): *DNA-based methods for food authentication*. Trends in Food Science & Technology, 11, 67e77;
103. Loffert, D. (1997): *PCR: Effects of template quality*. Qiagen News 1:8–10;
104. Logan, C.A., Alter, S.E., Haupt, A.J., Tomalty, K, Palumbi, S.R. (2008): *An impediment to consumer choice: overfished species are sold as Pacific red snapper*. Biological Conservation 141(6), 1591-1599;
105. Manfrin, G., Piccinetti, C. (1983): *Distribution de Pelagia noctiluca (Forsk.) en Méditerranée dans l'été 1983*. Workshop on Jellyfish Blooms in the Mediterranean, Athens, Greece, 31 October – 4 November, 1983; UNEP: Athens, 1984; pp. 25-32;
106. Mariottini, G.L., Giacco, E., Pane, L. (2008): *The Mauve Stinger Pelagia noctiluca (Forsskal, 1775). Distribution, Ecology, Toxicity and Epidemiology of Stings. A Review*. Marine Drugs 6(3):496-513;
107. Mariottini, G.L., Pane, L. (2010): *Mediterranean jellyfish venoms: a review on scyphomedusae*. Marine Drugs 8:1122-1152;
108. Marko, P.B., Lee, S.C., Rice, A.M., Gramling, J.M, Fitzhenry, T.M., McAllister, J.S., Harper, G.R., Moran, A.L. (2004): *Mislabelling of a depleted reef fish*. Nature 430(6997), 309-310;
109. Markoulatos, P., Sifakas, N., Moncany, M. (2002): *Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach*. J Clin Lab Anal 16(1):47-51;
110. Martin, L.E. (1999): *The population biology and ecology of Aurelia sp. (Scyphozoa: Semaestomeae) in a tropical meromictic marine lake in Palau, Micronesia*. Ph.D. thesis, University of California, Los Angeles: 250 pp.
111. Martinsohn, J.T. (2011): *Deterring illegal activities in the fisheries sector. Genetics, Genomics, Chemistry and Forensics to Fight IUU Fishing and in Support of Fish Product Traceability*. JRS Reference Report, Publicational Office of the European Union;
112. Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G. (2004): *Biochimica*. Milano, Casa Editrice Ambrosiana, giugno 2004;
113. McClatchey, K. D. (2002): *Clinical Laboratory Medicine, 2nd ed*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, p 1693;
114. Meusnier, I., Singer, G. A., Landry, J. F., Hickey, D. A., Hebert, P. D., Hajibabaei, M. (2008): *A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis*. BMC Genomics, 9(1), 214;
115. Mianzan, H.W. (1986): *Estudio sistemático y bioecológico de algunas medusas Scyphozoa de la región subantártica*. PhD, La Plata;

116. Mianzan, H.W., Ramirez, F.C., Costello, J.H., Chiaverano, L. (2005): *Un mar de gelatina?* Ciencia Hoy 15:48-55;
117. Miller, D.D., Mariani, S. (2010): *Smoke, mirrors, and mislabelled cod: poor transparency in the European seafood industry.* Frontiers in Ecology and the Environment 8, 517-521;
118. Monti, M., Ponzi, L. (2013): *Cibo criminale. Il nuovo business della mafia italiana.* Newton Compton editori.
119. Moretti, V. M., Turchini, G. M., Bellagamba, F., Caprino, F. (2003): *Traceability issues in fishery and aquaculture products.* Veterinary research communications, 27, 497-505.
120. Morrison, D. J., Preston, T., Bron, J. E., Hemderson, R. J., Cooper, K., Strachan, F., Bell, J. G. (2007): *Authenticating production origin of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by chemical and isotopic fingerprinting.* Lipids,42(6), 537-545;
121. Moser, M., Kniel, J., Schmitz-Winnenthal, C., Hupfer, K., Engel, H. (1999): *Einfluss verfarhrehstechnischer parameter auf den analytischen nachweisngentechniscn veranderter zutaten in backwaren.* Getreide Mehl und Brot 53:334-341;
122. Muhammed, F.; Sultana, R. (2008): *New record of edible jellyfish *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomatidae) from Pakistani waters.* Mar. Biodivers. Rec., 1, e67;
123. Nebbia, G. (1962): *Aspetti storici del problema del controllo della qualità delle merci nel mondo antico e nel Medioevo.* Quaderni di Merceologia: 327-380;
124. Nishikawa, J., Thu, H.H., Ha, T.M., Thu, P.T. (2008): *Jellyfish fisheries in northern Vietnam.* Plankton Benthos Res 3:227-234;
125. Nsubuga, A. M., Robbins, M. M., Roeder, A. D., Morin, P. A., Boesch, C., Vigilant, L. (2004): *Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method.* Molecular Ecology, 13(7), 2089-2094;
126. Omori, M., Nakano, E. (2001): *Jellyfish fisheries in southeast Asia.* Hydrobiologia 451:19-26;
127. Omori, M., Kitamura, M. (2004): *Taxonomic review of three Japanese species of edible jellyfish (Scyphozoa: Rhizostomeae).* Plankton Biology and Ecology Journal 51:36-51;
128. Palumbi S, Kewalo AM, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski, G. (2002): *The Simple Fool's Guide to PCR.* Simple Fool's Guide; (On-line) <http://palumbi.stanford.edu/SimpleFoolsMaster.pdf>;

129. Pelt-Verkuil, E.; van Belkum, A.; Hays, J. P. (2008): *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer Science + Business Media B.V.: New York, p 325;
130. Pereira, F., Carneiro, J., Amorim, A. (2008): *Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges*. Recent patents on DNA & gene sequences, 2(3), 187-200.
131. Perry, H., Larsen, K. (2004): *Picture Guide to Shelf Invertebrates of the Northern Gulf of Mexico*. NOAA National Marine Fisheries Service;
132. Pikor, L. A., Enfield, K. S., Cameron, H., Lam, W. L. (2011): *DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses*. J Vis Exp, 49.
133. Piñeiro, C., Sotelo, C. G., Medina, I., Gallardo, J. M., Pérez-Martín, R. I. (1997): *Reversed-phase HPLC as a method for the identification of gadoid fish species*. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 204(6), 411-416;
134. Piraino, S.; Aglieri, G.; Martell, L.; Mazzoldi, C.; Melli, V.; Milisenda, G.; Scorrano, S.; Boero, F. (2014) *Pelagia benovici sp. nov. (Cnidaria, Scyphozoa): A new jellyfish in the Mediterranean Sea*. Zootaxa 2014, 3794 (3), 455–468;
135. Pitt, K.A. & Kingsford, M.J. (2000): *Reproductive biology of the edible jellyfish *Catostylus mosaicus* (Rhizostomeae)*. Marine Biology (2000) 137:791-799;
136. Poole, S., Edwards, J., Naidoo, R. (2002): *How to create a shelf stable marinated jellyfish product from the underutilized species “*Catostylus mosaicus*”*. (On-line) Seafood Services Australia <https://seafood.net.au/downloads/PDF-RD520.pdf>;
137. Prieto, L., Armani, A., Macías, D. (2013): *Recent strandings of the giant jellyfish *Rhizostoma luteum* Quoy & Gaimard 1827(Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae) on the Atlantic and Mediterranean coasts*. Marine Biology doi:10.1007/s00227-013-2293-6 ; products. J Agric Food Chem 55:3681–3685;
138. Quoy, J.R.C., Gaimard, J.P. (1827): *Observations zoologiques faites à bord de l’Astrolabe en mai 1826, dans le détroit de Gibraltar*. Annales des sciences naturelles Paris 10:175;
139. Rådström, P., Knutsson ,R., Wolffs, P., Lövenklev, M., Löfström, C. (2004): *Pre- PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples*. Mol Biotechnol. 26(2):133-46;
140. Rasmussen, R. S., Morrissey, M. T. (2009): *DNA-Based Methods for the Identification of Commercial Fish and Seafood Species*. Comprehensive reviews in food science and food safety, 7(3), 280-295.
141. Rasmussen, R. S., Hellberg, R. S., Morrissey, M. T., Hanner, R. H. (2010): *A multiplex*

- PCR method for the identification of commercially important salmon and trout species (Oncorhynchus and Salmo) in North America. Journal of Food Science, 75, 595–606;*
142. Rehbein, H. (2003): *Identification of fish species by protein and DNA-analysis*. In Perez- Martin R., Soletto C.G. (Eds.), *Authenticity of species in meat and seafood products*, Association “International Congress on Authenticity of Species in Meat and Seafood Products”;
 143. Rossen, L., Norskow, P., Holmstrom, K., Ramussen, O.F. (1992): *Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions*. *Int J Food Microbiol* 17(1):37-45;
 144. Ruano, G.; Fenton, W.; Kidd, K. K. (1989): *Biphasic amplification of very dilute DNA samples via “booster” PCR*. *Nucleic Acids Res.*, 17, 5407;
 145. Russell, F. S. (1971): *The medusae of the British Isles II. Pelagic Scyphozoa with a supplement to the first volume on hydromedusae*. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol. Hydrogr.*, 56 (4), 686
 146. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, R. (1977): *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12):5463-5467.
 147. Sangha, J. S., Schumm, J. W., Fox, J. C., Bever, R. A. (2003): U.S. Patent No. 20,030,113,906. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
 148. Schembri, P.J., Deidun, A., Vella, P.J. (2010): *First record of Cassiopea andromeda (Scyphozoa: Rhizostomeae: Cassiopeidae) from the central Mediterranean Sea*. *Marine Biodiversity Records* 3: e6; doi:10.1017/S1755267209990625;
 149. Schiariti, A., Kawahara, M., Uye, S., Mianzan, H.W. (2008); *Life cycle of the jellyfish Lychnorhiza lucerna (Scyphozoa: Rhizostomeae)*. *Marine Biology* Volume 156, Issue 1, pp. 1-12;
 150. Scialpi A., Mengoni A. (2008): *La PCR e le sue varianti, quaderno di laboratorio*. Firenze University Press, Italia, Firenze;
 151. Sellitto, A., Cacace, D. (2007): *Panorama della legislazione in tema di sicurezza alimentare nel settore ittico*. *Supplem. Ind. Conserve* (2007) pp 36;
 152. Semeraro, A.M. (2011): *Frodi alimentari: aspetti tecnici e giuridici*. *Rassegna di Diritto, Legislazione e Medicina Legale Veterinaria*;
 153. Sloan, N.A., Gunn, C.R. (1985): *Fishing, processing and marketing of jellyfish (Aurelia aurita), from Southern British Columbia*. *Canadian Industry Report of Fisheries and Aquatic Sciences* n. 157;
 154. Smith, P. J., McVeagh, S. M., Steinke, D. (2008): *DNA barcoding for the identification*

- of smoked fish products*. Journal of Fish Biology, 72(2), 464-471;
155. Spink, J., Moyer, D.C. (2011) *Backgrounder: defining the public health threat of food fraud*. Minneapolis, Minnesota: National Centre for food protection and defense. (On-line) <http://foodfraud.msu.edu/wp-content/uploads/2014/07/food-fraud-ffg-backgrounderv11-Final.pdf>
 156. Sterrer, W. (1986): *Marine fauna and flora of Bermuda. A systematic guide to the identification of marine organisms*. John Wiley & Sons, Inc. pp 158-159;
 157. Stiasny, G (1931): *Die Rhizostomeen. Sammlung des British Museum (Natural History) in London*. Zool. Meded 14:137-178;
 158. Stiles, M.L., Lahr, H., Lahey, W., Shaftel, E., Bethel, D., Falls, J., Hirshfiel, M.S. (2011): *Bait and switch: how seafood fraud hurts our oceans, our wallets and our health*. Oceana (On-line) <http://oceana.org/en/news-media/publications/reports/baitand/-switch-how-seafood-fraud-hurts-our-oceans-our-walletsand-our-health.pdf>;
 159. Teletchea, F.; Maudet, C.; Hanni, C. (2005): *Food and forensic molecular identification: Update and challenges*. Trends Biotechnol., 7, 360–366.
 160. Teletchea, F. (2009): *Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 19(3), 265-293;
 161. Trotta, M., Scho-Nhuth, S., Pepe, T., Cortesi, M. L., Puyet, A., Bautista, J. M. (2005): *Multiplex PCR method for use in real-time PCR for identification of fish fillets from grouper (Epinephelus and Mycteroperca sp.) and common substitute species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 2039-2045.
 162. Uchida, T. (1927): *Report of the biological survey of Mutsu Bay. 2. Medusae of Mutsu Bay*. Science Report Tohoku University, Biol. 2:215-238;
 163. Uchida, T. (1954): *Distribution of Scyphomedusae in Japanese and its adjacent waters*. Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University, Ser. 6, Zool. 12:209-219;
 164. Uye, S. (2008): *Blooms of the giant jellyfish Nemopilema nomurai: a threat to the fisheries of the East Asian Marginal Seas*. Plankton and Benthos Research, 3:125-131;
 165. Vanhoffen, E. (1888): *Untersuchungen uber semastome und rhizostome Medusen*. Bibliotheca Zoologica, Stuttgart 1(3):1-52;
 166. Weyant, R.S., Edmonds, P., Swaminathan, B. (1990): *Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase*. Biotechniques 9(3):308-309;
 167. Wilson, I.G. (1997): *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*. Applied and Environmental Microbiology 63(10):3741-3751;

168. Wilson, B. (2008) *Swindled: the dark history of food fraud, from poisoned candy to counterfeit coffee*. Princeton University Press;
169. Wong, W. W. K.; Chung, S. W. C.; Kwong, K. P.; Yin, H. Y.; Xiao, Y. (2010): *Dietary exposure to aluminium of the Hong Kong population*. Food Addit. Contam., 27 (4), 457–463;
170. Woolfe, M., Primrose, S. (2004) *Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud*. TRENDS in Biotechnology, 22(5), 222-226;
171. Xie, Z.M., Wang, Y.X., Huang, M.X. (2004): *Technology of jellyfish (R.esculentum) culture and enhance*. Jin Dun Publ, Beijin (in Chinese);
172. You, K., Ma, C., Gao, H., Li, F., Zhang, M., Qiu, Y., Wang, B. (2007): *Research on the jellyfish (Rhopilema esculentum Kishinouye) and associated aquaculture techniques in China: current status*. Aquaculture International 15:479-488;

RIFERIMENTI NORMATIVI

- **Decreto Legislativo n. 109/92** del 27 gennaio 1992 “Attuazione delle direttive n. 89/395/CEE e n. 89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari”. G.U. n. 39 del 17 febbraio 1992;
- **Decreto Legislativo n. 531/1992** del 30 dicembre 1992 “Attuazione della direttiva 91/493/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei prodotti della pesca, tenuto conto delle modifiche apportate dalla direttiva 92/48/CEE che stabilisce le norme igieniche minime applicabili ai prodotti della pesca ottenuti a bordo di talune navi”. G.U. n. 7 del 11 gennaio 1993;
- **Decreto Legislativo n. 181/2003** del 23 giugno 2003 “Attuazione della direttiva 2000/13/CE concernente l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità”. G.U. n.167 del 21 luglio 2003;
- **Decreto Legislativo n. 193/2006** del 6 aprile 2006 “Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari”. GU n.121 del 26 maggio 2006;
- **Decreto Legislativo n. 193/2007** del 6 novembre 2007 “Attuazione della direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore”. G.U. n. 261 del 9 novembre 2007;
- **Decreto MIPAAF (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali) del 27 marzo 2002** “Etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo”. G.U. n. 84 del 10 aprile 2002;
- **Decreto MIPAAF 12 agosto 2011** “Attribuzione della denominazione in lingua italiana di alcune specie ittiche, che integra e modifica l'elenco allegato al DM del 31 gennaio 2008 e al DM del 23 dicembre 2010”. G.U. n. 208 del 7 settembre 2011;
- **Direttiva 79/112/CEE** del Consiglio, del 18 dicembre 1978 “relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità”. G.U. n L33 dell' 8 febbraio 1979;
- **Direttiva 91/493/CEE** del Consiglio del 22 luglio 1991 “che stabilisce norme sanitarie applicabili alla produzione e alla commercializzazione dei prodotti della pesca”. G.U. n. L268 del 24 settembre 1991;
- **Direttiva 95/2/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 febbraio 1995 “relativa agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dagli edulcoranti”. G.U. n.

- L61 del 18 marzo 1995;
- **Direttiva 98/6/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 febbraio 1998 *“relativa alla protezione dei consumatori in materia di indicazione dei prezzi dei prodotti offerti ai consumatori”*. G.U. delle Comunità europee n. L80/27 del 18 marzo 1998;
 - **Direttiva 1999/2/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 *“relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti”*. G.U. n. L66 del 13 marzo 1999;
 - **Direttiva 2000/13/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 marzo 2000 *“relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri concernenti l’etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità”*. G.U. delle Comunità europee n. L109/29 del 6 maggio 2000;
 - **Direttiva 2003/89/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 10 novembre 2003 *“che modifica la direttiva 2000/13/CE per quanto riguarda l’indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari”*. G.U. dell’Unione europea n. L308/15 del 25 novembre 2003;
 - **Direttiva 2003/114/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 dicembre 2003 *“che modifica la direttiva 95/2/CE relativa agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dagli edulcoranti”*. G.U. dell’Unione europea n. L24/58 del 29 gennaio 2004;
 - **Direttiva 2004/41/CE** del Parlamento europeo e del Consiglio del 21 aprile 2004 *“che abroga alcune direttive recanti norme sull’igiene dei prodotti alimentari e le disposizioni sanitarie per la produzione e la commercializzazione di determinati prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che modifica le direttive 89/662/CEE e 92/118/CEE e la decisione 95/408/CE del Consiglio”*. G.U. dell’Unione europea n. L157/33 del 30 aprile 2004;
 - **Legge 40/2007** del Parlamento Italiano del 2 aprile 2007 *“Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 31 gennaio 2007, n. 7, recante misure urgenti per la tutela dei consumatori, la promozione della concorrenza, lo sviluppo di attività economiche e la nascita di nuove imprese”*. G.U. n. 77 del 2 aprile 2007;
 - **Regolamento (CE) n. 2406/96** del Consiglio del 26 novembre 1996 *“che stabilisce norme comuni di commercializzazione per taluni prodotti della pesca”*. G.U. n. L334

del 23 dicembre 1996;

- **Regolamento (CE) n. 104/2000** del Consiglio del 17 dicembre 1999 “*relativo all’organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell’acquacoltura*”. G.U. delle Comunità europee n. L17/22 del 21 gennaio 2000;
- **Regolamento (CE) n. 2065/2001** della Commissione del 22 ottobre 2001 “*che stabilisce le modalità d’applicazione del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l’informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell’acquacoltura*”. G.U. delle Comunità europee n. 278 del 23 ottobre 2001;
- **Regolamento (CE) n. 178/2002** del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002 “*che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l’Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare*”. G.U. delle Comunità Europee n. L31/1 del 1 febbraio 2002;
- **Regolamento (CE) n. 852/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 “*sull’igiene dei prodotti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n. L139/1 del 30 aprile 2004;
- **Regolamento (CE) n. 853/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 “*che stabilisce norme specifiche in materia di igiene degli alimenti di origine animale*”. G.U. dell’Unione europea n. L139/55 del 30 aprile 2004;
- **Regolamento (CE) n. 854/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 “*che stabilisce norme specifiche per l’organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano*”. G.U. dell’Unione europea n. L226/83 del 25 giugno 2004;
- **Regolamento (CE) n. 882/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 “*relativo ai controlli ufficiali destinati a verificare la conformità della normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali*”. G.U. dell’Unione europea n. L191 del 28 maggio 2004;
- **Regolamento (CE) n. 1935/2004** del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 ottobre 2004 “*riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire in contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE*”. G.U. dell’Unione europea n. L338/4 del 13 novembre 2004;
- **Regolamento (CE) n. 2073/2005** del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 novembre 2005 “*sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n. L338/1 del 22 dicembre 2005;

- **Regolamento (CE) n. 2074/2005** del Parlamento europeo e del Consiglio del 5 dicembre 2005 *“recante modalità di attuazione relative ad alcuni prodotti di cui al regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e all’organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) N. 854/2004 e (CE) N. 882/2004, deroga al regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e modifica dei regolamenti (CE) N. 853/2004 e (CE) N. 854/2004”*. G.U. dell’Unione europea n. L338/27 del 22 dicembre 2005;
- **Regolamento (CE) n 199/2006** della Commissione del 3 febbraio 2006 *“che modifica il regolamento (CE) n 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari per quanto riguarda le diossine e i PCB diossina-simili”*. G.U. dell’Unione europea n L32/34 del 4 febbraio 2006;
- **Regolamento (CE) n. 1881/2006** della Commissione del 19 dicembre 2006 che *“definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nei prodotti alimentari”*. G.U. dell’Unione europea n. L364/5 del 20 dicembre 2006;
- **Regolamento (CE) n. 1441/ 2007** della Commissione del 5 dicembre 2007 *“che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari”*. G.U. dell’Unione europea n. L322/12 del 7 dicembre 2007;
- **Regolamento (CE) n. 1022/2008** della Commissione del 17 ottobre 2008 *“recante modifica del regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda i valori limite di azoto basico volatile totale (ABVT) nei prodotti della pesca”*. G.U. dell’Unione europea n. L277/18 del 18 ottobre 2008;
- **Regolamento (CE) n 470/2009** del Parlamento europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009 *“che stabilisce procedure comunitarie per la determinazione di limiti di residui di sostanze farmacologicamente attive negli alimenti di origine animale, abroga il regolamento (CEE) n 2377/90, modifica la direttiva 2001/82/CE e il regolamento CE n 726/2004”*. G.U. delle Unione europea n L152/11 del 16 giugno 2009;
- **Regolamento (CE) n. 1224/2009** del Consiglio del 20 novembre 2009 *“che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca, che modifica i regolamenti (CE) n. 847/96, (CE) n. 2371/2002, (CE) n. 811/2004, (CE) n. 768/2005, (CE) n. 2115/2005, (CE) n. 2166/2005, (CE) n. 388/2006, (CE) n. 509/2007, (CE) n. 676/2007, (CE) n. 1098/2007, (CE) n. 1300/2008, (CE) n. 1342/2008 e che abroga i regolamenti (CEE) n. 2847/93, (CE) n. 1627/94 e (CE) n. 1966/2006”*. G.U. dell’Unione europea n. L343/1 del 22 dicembre

- 2009;
- **Regolamento (UE) n. 37/2010** della Commissione del 22 dicembre 2009 “*concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale*”. G.U. dell’Unione europea n L15/1 del 20 gennaio 2010;
 - **Regolamento (CE) n. 238/2010** della Commissione del 22 marzo 2010 “*che modifica l’allegato V del regolamento (CE) n. 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda la prescrizione relativa all’etichettatura delle bevande con contenuto alcolico superiore all’1,2 % in volume e che contengono determinati coloranti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n. L75/17 del 23 marzo 2010;
 - **Regolamento di esecuzione (UE) n. 404/2011** della Commissione dell’8 aprile 2011 “*recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1224/2009 del Consiglio che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca*”. G.U. n L112 del 30 aprile 2011;
 - **Regolamento (UE) n. 835/2011** della Commissione del 19 agosto 2011 “*che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di idrocarburi policiclici aromatici nei prodotti alimentari*”. G.U. dell’Unione europea n L215/4 del 20 agosto 2011;
 - **Regolamento (UE) n. 1169/2011** del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011 “*Relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 155/2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione*”. G.U. dell’Unione europea n. L304/18 del 22 novembre 2011;
 - **Regolamento di esecuzione (UE) n. 1337/2013** del Parlamento europeo e del Consiglio del 13 dicembre 2013 “*che fissa le modalità di applicazione del Regolamento (UE) n. 1169/2011 per quanto riguarda l’indicazione del paese di origine o del luogo di provenienza delle carni fresche, refrigerate o congelate di animali della specie suina, ovina, caprina e di volatili*”. G.U. dell’Unione europea n. L335/19 del 14 dicembre 2013.
 - **Regolamento (UE) n. 1379/2013** del Parlamento europeo e del Consiglio dell’11 dicembre 2013 “*relativo all’organizzazione comune dei mercati nel settore dei*

prodotti della pesca e dell'acquacoltura". G. U. dell'Unione europea n. L 354/1 del 28 dicembre 2013.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la prof.ssa Alessandra Guidi, il dottor Andrea Armani, la dott.ssa Alice Giusti, il dottor Lorenzo Castigliero, la dott.ssa Lara Tinacci, la dott.ssa Lisa Guardone, la dott.ssa Priscilla D'Amico e il dottor Xiong Xiong per la loro disponibilità e per essermi stati vicini, passo dopo passo, durante la realizzazione della mia tesi.

Un grazie di cuore va all'amica Alice, senza l'aiuto della quale non sarei mai riuscito a portare a compimento questo lavoro nel tempo previsto.

Tengo a ricordare con affetto tutti i miei amici e colleghi di corso, "vecchi e nuovi", con i quali ho condiviso attimi di gioia e di "dolore" durante il mio percorso universitario; tra tutti, voglio ringraziare l'amico Riccardo che con le sue coinvolgenti imitazioni è sempre stato in grado di strapparmi un sorriso.

Voglio inserire tra i ringraziamenti anche tutti i miei compagni e le mie compagne di volley per avermi fatto comprendere il vero significato dell'essere una squadra sia in campo che fuori; in particolare un grazie enorme va ad Alessandro, Giada e Piero.

A Kety, la persona più genuina e sincera che mi sia mai stata vicina.

Infine ringrazio tutta la mia famiglia per avermi sempre sostenuto pazientemente in tutti questi anni di studio; soprattutto ringrazio mia madre Giovanna, mio padre Enzo, mia sorella Giulia, le mie nonne Diana e Elda, i miei cugini Alessandro, Francesco e Giacomo, i miei zii e zie: Marco, Stefano, Manuela e Susanna. Alla fine colgo l'occasione per ricordare con amore i miei nonni Elio e Silvano...che avrei voluto fossero presenti con me in questo giorno. Grazie...grazie veramente a tutti Voi per avermi reso l'uomo che sono adesso.