



Università di Pisa

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

TESI DI LAUREA

DNA barcoding per il rilevamento di frodi in prodotti ittici
commercializzati nelle comunità etniche

Candidato:

Riccardo La Castellana

Relatore:

Andrea Armani

Correlatore:

Alessandra Guidi

Anno Accademico 2014/2015

Riassunto

Il numero di specie ittiche vendute sui mercati occidentali è in costante crescita e sono molte le specie non convenzionali vendute in negozi alimentari etnici. In questo studio, sono stati raccolti dal mercato italiano 68 prodotti ittici etnici variamente trasformati; su questi è stata eseguita un'analisi molecolare attraverso sequenziamento del frammento ottenuto con la tecnica del full DNA Barcoding (FDB, ~ 655 pb) o del mini DNA Barcoding (MDB, ~ 139 pb) per mezzo di primer universali. Le sequenze ottenute sono state poi confrontate con le sequenze disponibili su BOLD e GenBank. Inoltre, è stata eseguita un'analisi delle informazioni riportate in etichetta in base alla legislazione europea. Utilizzando il sistema di identificazione su BOLD è stata recuperata un'identità massima di specie $\geq 98\%$ per l'84% delle sequenze. Di queste, il 67% sono state identificate in modo univoco a livello di specie (51,3% del FDB e il 74% del MDB). Utilizzando NCBI BLAST, il 74% delle sequenze ha segnato un'identità massima di specie $\geq 98\%$, di cui il 73% sono state identificate a livello di specie (52% del FDB e 61% del MDB). Una maggiore efficacia è stata osservata in entrambi i *database* per l'identificazione dei molluschi. Nel complesso, 45 prodotti (66%) non sono risultati correttamente etichettati secondo le normative europee. Infine, confrontando le informazioni riportate in etichetta con quelle ottenute dall'analisi molecolare è stato evidenziato che il 48,5% dei prodotti presentava delle non conformità. In particolare, sono stati evidenziati 2 casi di frode sanitaria in 2 prodotti etichettati come calamari ma identificati come *Lagocephalus* spp. La commercializzazione dei pesci palla, a cui questa specie appartiene, è infatti vietata sul mercato europeo. Gli attuali risultati confermano che il DNA *barcoding* sia uno strumento affidabile per salvaguardare gli interessi economici e la salute dei consumatori.

Parole chiave: prodotti ittici etnici, DNA *barcoding*, gene COI mitocondriale, identificazione di specie

Abstract

The number of seafood species sold on Western markets is constantly growing and many unconventional species are sold in ethnic food outlets. In this work, 68 ethnic seafood products variously processed were collected from the Italian market and a molecular analysis was performed by sequencing a full cytochrome c oxidase (COI) DNA barcode (FDB, ~655 bp) or a mini COI DNA barcode (MDB, ~139 bp) using universal primers. Barcodes were then compared with sequences available in BOLD and GenBank. In addition, the label information was assessed according to the European legislation. By using the IDs analysis on BOLD a maximum species identity $\geq 98\%$ was retrieved for 84% of the sequences. Of these, 67% were unambiguously identified at species level (51.3% of the FDB and 74% of the MDB). Using NCBI BLAST, 74% of the sequences scored a maximum species identity $\geq 98\%$, of which 73% were identified at species level (52% of the FDB and 61% of the MDB). Both databases performed better in mollusk identification. Overall, 45 products (66%) were not correctly labeled according to the European requirements. Finally, the comparison between the molecular and the label analysis highlighted that 48.5% of the products presented discrepancies between labeling and molecular identification. In particular, health implications were highlighted for 2 samples labeled as squid but identified as *Lagocephalus* spp., a poisonous puffer fish species banned from the EU market. The present results confirm DNA barcoding as a reliable tool for protecting consumers' health and economic interests.

Key words: ethnic seafood, DNA barcoding, mitochondrial *COI* gene, species identification

INDICE

ABSTRACT

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| CAPITOLO 1 | PESCA E ACQUACOLTURA NEL CONTESTO GLOBALE | 8 |
| 1.1 | CONTESTO SOCIO-ECONOMICO | 8 |
| 1.2 | PRODUZIONE ED ESPORTAZIONE CINESE E BENGALESE | 9 |
| 1.2.1 | <i>La Cina</i> | 9 |
| 1.2.2 | <i>Il Bangladesh</i> | 11 |
| 1.3 | PROBLEMATICHE ISPETTIVE RELATIVE AI PRODOTTI ALIMENTARI D'IMPORTAZIONE DA CINA E BANGLADESH | 12 |
| CAPITOLO 2 | LA SICUREZZA ALIMENTARE NELL'UNIONE EUROPEA ED I CONTROLLI SUI PRODOTTI D'IMPORTAZIONE A LIVELLO EUROPEO | 15 |
| 2.1 | NORMATIVA COMUNITARIA SULLA SICUREZZA ALIMENTARE (REG.178/2002 E PACCHETTO IGIENE) | 15 |
| 2.2 | POSTI D'ISPEZIONE FRONTALIERA (PIF) | 19 |
| CAPITOLO 3 | COMUNITÀ ETNICHE CINESI E BENGALSI PRESENTI IN ITALIA | 21 |
| 3.1 | COMUNITÀ CINESI | 21 |
| 3.2 | COMUNITÀ BENGALSI | 25 |
| CAPITOLO 4 | FRODI NEL COMPARTO ALIMENTARE | 29 |
| 4.1 | FRODI SANITARIE E COMMERCIALI | 29 |
| 4.1.1 | <i>Frodi sanitarie</i> | 31 |
| 4.1.2 | <i>Frodi commerciali</i> | 32 |
| 4.2 | FRODI NEL COMPARTO ITTICO | 34 |
| CAPITOLO 5 | STRUMENTI CONTRO LE FRODI | 38 |
| 5.1 | TRACCIABILITÀ E RINTRACCIABILITÀ | 38 |
| 5.2 | ETICHETTATURA DEI PRODOTTI DELLA PESCA | 40 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| 5.3 | TECNICHE MOLECOLARI BASATE SULL'ANALISI DEL DNA PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE NEI PRODOTTI ITTICI | 42 |
| 5.3.1 | <i>Estrazione del DNA</i> | 44 |
| 5.3.2 | <i>Valutazione del DNA estratto</i> | 46 |
| 5.3.3 | <i>Degradazione del DNA</i> | 46 |
| 5.3.4 | <i>Amplificazione del DNA: Polymerase Chain Reaction</i> | 47 |
| 5.3.5 | <i>Metodiche di sequenziamento del DNA</i> | 50 |
| 5.3.6 | <i>DNA barcoding</i> | 52 |
| CAPITOLO 6 | SCOPO DELLA TESI | 56 |
| CAPITOLO 7 | MATERIALI E METODI | 57 |
| 7.1 | RACCOLTA DEI CAMPIONI | 57 |
| 7.2 | ANALISI MOLECOLARI | 57 |
| 7.2.1 | <i>Prelievo del tessuto, estrazione del DNA, valutazione del frammento di DNA con elettroforesi su gel di agarosio</i> | 57 |
| 7.2.2 | <i>Full DNA barcoding: amplificazione e sequenziamento</i> | 58 |
| 7.2.3 | <i>Mini DNA barcoding: amplificazione e sequenziamento</i> | 58 |
| 7.2.4 | <i>Analisi delle sequenze e confronto con i database</i> | 59 |
| 7.3 | ANALISI DELLE INFORMAZIONI RIPORTATE IN ETICHETTA | 59 |
| CAPITOLO 8 | RISULTATI E DISCUSSIONI | 60 |
| 8.1 | RACCOLTA DEI CAMPIONI | 60 |
| 8.2 | ANALISI MOLECOLARI | 60 |
| 8.2.1 | <i>Estrazione del DNA e valutazione della frammentazione del DNA mediante elettroforesi su gel</i> | 60 |
| 8.2.2 | <i>Amplificazione e sequenziamento</i> | 61 |
| 8.2.3 | <i>Confronto con i database</i> | 62 |
| 8.3 | ANALISI DELLE INFORMAZIONI RIPORTATE IN ETICHETTA | 64 |

| | | |
|-----|--|----|
| 8.4 | CONFRONTO TRA LE ANALISI MOLECOLARI E LE INFORMAZIONI RIPORTATE IN ETICHETTA | 65 |
| 8.5 | IMPLICAZIONI PER LA SALUTE | 66 |
| | CONCLUSIONI | 70 |
| | BIBLIOGRAFIA | 71 |
| | SITOGRAFIA | 85 |
| | RIFERIMENTI NORMATIVI | 87 |
| | APPENDICE | 90 |

CAPITOLO 1

Pesca e acquacoltura nel contesto globale

1.1 Contesto socio-economico

I prodotti ittici sono una delle materie prime alimentari più commercializzate nel mondo e il modo in cui i prodotti della pesca vengono trasformati e distribuiti ne ha reso possibile l'immissione nel mercato globale. Molti sono i fattori che hanno contribuito a questa globalizzazione:

- la sostanziale diminuzione dei costi di trasporto e di comunicazione;
- i vantaggi competitivi derivanti dall'esternalizzazione dei processi di trasformazione in paesi con salari e costi di produzione relativamente più bassi;
- l'aumento del consumo di prodotti della pesca;
- le politiche favorevoli alla liberalizzazione commerciale;
- un sistema di distribuzione e operazioni di marketing più efficienti;
- la continua innovazione tecnologica.

Il ruolo del commercio dei prodotti della pesca varia tra i paesi ma è importante soprattutto per quelli in via di sviluppo. In particolare, per molti paesi e numerose regioni insulari, costiere, fluviali e dell'entroterra, le esportazioni della pesca sono essenziali. Nel periodo 1976-2012, il commercio mondiale di pesce e prodotti della pesca è aumentato di circa l'8,3% l'anno. Le esportazioni di prodotti della pesca hanno raggiunto un picco di 129.800.000.000 di dollari nel 2011, in crescita del 17% rispetto al 2010. Nel 2012, le esportazioni sono diminuite leggermente raggiungendo i 129.200.000.000 di dollari (*The State of World Fisheries and Aquaculture*, 2014).

Nel corso degli ultimi due decenni il volume totale di prodotti ittici sul mercato internazionale è aumentato da circa 10 milioni a circa 24 milioni di tonnellate. Nel 2000, quasi la metà del volume dei prodotti ittici movimentata nel mercato internazionale è stata esportata da paesi in via di sviluppo verso i paesi sviluppati (Yasuada & Bowen, 2006).

Dal 1990 l'occupazione nel settore è cresciuta a un tasso più rapido della crescita della popolazione mondiale e, nel 2012, ha fornito occupazione a circa 60 milioni di persone impegnate sia nel settore della pesca in mare aperto che in quello dell'acquacoltura. Di queste,

l'84% si trova in Asia, seguita dall'Africa con circa il 10% (<http://www.fao.org/news/story/it/item/231593/icode/>).

In particolare, le produzioni, i consumi e l'esportazioni di prodotti della pesca dai paesi asiatici in via di sviluppo come Thailandia, Cina, Vietnam, Indonesia, India e Bangladesh sono cresciuti in modo significativo negli ultimi tre decenni in seguito agli sviluppi tecnologici e ai cambiamenti politici globali degli ultimi 20-30 anni (<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13657300590961537#abstract>). Inoltre la quota di esportazioni verso i paesi in via di sviluppo è aumentata ad un tasso di crescita medio annuo del 31,6% (FAO, 2002), a causa della continua espansione del processo di *outsourcing* che vede i paesi asiatici in prima linea (*Out of Site: An Inside Look at HR Outsourcing*, Beaman, 2004).

Fra tutti i Paesi del continente asiatico, la Cina si piazza al primo posto per produzione di pesce derivante da acquacoltura e da catture in acque interne e marine, mentre il Bangladesh si posiziona al quarto posto per catture da acque interne e al quinto posto per l'acquacoltura (*The State of World Fisheries and Aquaculture*, 2014).

1.2 Produzione ed esportazione cinese e bengalese

1.2.1 La Cina

La Cina si affaccia nel XXI secolo come una delle più potenti nazioni del panorama internazionale; dopo anni di declino e di chiusura verso il mondo esterno riappare con nuovo impeto, vigore e grandi potenzialità economiche. Con circa 18.000 chilometri di costa che permettono un ampio sbocco sul mar Giallo, sul mar Cinese Orientale e Meridionale e sul mar di Bo Hai, con circa 370 laghi di cui 130 hanno una superficie che supera i 100 km² (http://www.cinacom.com/cina_geografica_02.html) e con un'estensione della rete fluviale che si aggira, complessivamente, attorno ai 220.000 km (http://www.voyagesphotosmanu.com/fiumi_cina.html) non sorprende affatto che la Cina sia stata la maggiore responsabile dell'aumentata disponibilità di pesce; nel 2012 le specie ittiche catturate ammontavano a 13.869.604 di tonnellate, le specie d'acqua dolce catturate a 2.297.839 di tonnellate, le specie ittiche e d'acqua dolce allevate a 41.108.306 di tonnellate (*The State of World Fisheries and Aquaculture*, 2014). Nel 2013, la Cina da sola ha prodotto 43,5 milioni di tonnellate di prodotti ittici. Tuttavia, molti fattori continuano a vincolare

l'accesso di paesi in via di sviluppo ai mercati internazionali, primo fra tutti il mancato rispetto delle norme sulla tracciabilità del prodotto (D'Amico *et al.*, 2014).

Dal 2011, la Cina si posiziona al terzo posto in termini di importazioni, dopo gli Stati Uniti e Giappone. L'aumento delle sue importazioni è in parte il risultato di un processo di esternalizzazione. Infatti, gli impianti di trasformazione cinesi importano materia prima da tutti i continenti, soprattutto da Sud e Nord America ed Europa, per la ri-elaborazione e la riesportazione.

Nel 2013, il commercio di prodotti della pesca ha raggiunto un valore di 19,6 miliardi dollari per le esportazioni e di 8,0 miliardi di dollari per le importazioni (*The State of World Fisheries and Aquaculture*, 2014). La Cina esporta prodotti ittici soprattutto negli Stati Uniti, seguono Europa e Giappone; Corea del Sud e Russia completano la *top five*. Nel 2009, la Cina ha esportato 1,945 miliardi di tonnellate di prodotti ittici verso gli Stati Uniti, Unione Europea, Giappone, Corea del Sud, Russia, Canada e Brasile (Tabella 1).

| Milioni di ton | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| USA | 584,400 | 578,400 | 568,600 | 625,900 |
| UE | 468,900 | 483,000 | 489,100 | 492,900 |
| Giappone | 548,400 | 466,600 | 405,700 | 424,600 |
| Corea del Sud | 490,800 | 368,600 | 339,000 | N/A |
| Russia | 104,300 | 101,900 | 77,900 | N/A |
| Canada | 59,600 | 52,500 | 57,000 | 61,600 |
| Brasile | 3,100 | 11,200 | 7,800 | 33,300 |

Tabella 1. Esportazioni prodotti ittici cinesi dal 2007 al 2010.

Fonte NMFS, Eurostat, Japanese customs, UN, and McDowell Group

Il principale prodotto ittico d'esportazione della Cina è rappresentato da filetti porzionati e congelati. I prodotti sotto forma di filetto hanno rappresentato il 41% di tutte le esportazioni cinesi a base di pesce nel 2009, e sono stati pari a 795.000 milioni di tonnellate. La Cina ha esportato nel 2009 609.500 milioni di tonnellate di prodotti ittici. Il mollusco principalmente esportato è il calamaro. La Cina esporta 287.000 tonnellate di frutti di mare preparati e conservati (affumicati, essiccati, trattati, precotti) (http://www.alaskaseafood.org/fishingprocessing/seafoodweb_may11/china.html). Secondo i rapporti del governo le specie allevate commercialmente sono più di 200, ma secondo le statistiche nazionali la produzione totale registrata conta meno di 90 specie e gruppi di specie.

Analisi della produzione dell'acquacoltura con ulteriori dettagli sulle specie allevate rimangono approssimative (*The State of World Fisheries and Aquaculture*, 2014).

1.2.2 Il Bangladesh

Dal 1971, anno in cui diviene uno stato indipendente, il Bangladesh ha avuto un tasso di crescita economico inferiore solo alla Cina (<http://www.imille.org/2012/09/bangladesh-dove-la-globalizzazione-basta/>). Sulla scena mondiale si presenta come una delle nazioni leader nella produzione di pesce proveniente da acquacoltura piazzandosi al sesto posto nella classifica mondiale secondo la FAO (2005). La produzione totale di pesce del Bangladesh è pari a 2,1 milioni di tonnellate di cui 914.752 tonnellate (il 43.5%) provenienti dal settore dell'acquacoltura (da stagni e fossati 795 810 tonnellate, dall'acquacoltura costiera 114.660 tonnellate, dal lago Kaptai 7.238 tonnellate e dalle lanche 4.282 tonnellate (DOF, 2005). L'acquacoltura in Bangladesh è aumentata del 6-8% l'anno durante il periodo 1991-2002 (Ahmed, 2003). Delle circa 200 specie presenti, quelle che vengono allevate o pescate sono principalmente carpe sia indigene che esotiche (*Catla catla*, *Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*, *Labeo calbasu*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Ctenopharyngodon idellus*, *Cyprinus carpio*), pesci gatto, crostacei (*Penaeus monodon*, *Macrobrachium rosenbergii*) e altre specie (*Puntius ticto*, *Amblypharyngodon mola*, *Colisa lalius*, *Anabas testudineus* e *Glossogobius giuris*). La IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) nel 2001 ha riferito che molti dei piccoli pesci indigeni sono oggi in pericolo di estinzione. (http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_bangladesh/en).

Circa il 97% della produzione ittica dell'entroterra è destinata al consumo interno, mentre il restante 3% viene esportato (Hasan, 2001). Il principale prodotto esportato sono i gamberetti congelati, altri prodotti esportati comprendono pesci e rane surgelati, pesce secco, pesce salato, tartarughe, granchi, pinne di squalo (DOF, 2003).

Sul totale di pesce e prodotti della pesca disponibili per l'esportazione il 30.06% viene esportato in USA, 48.51% nei paesi europei, il 9,32% in Giappone e il resto in Thailandia e paesi del Medio Oriente (Hossain, 2003) con un mercato del valore di 324.000.000 dollari, di cui solo i gamberi hanno contribuito per il 72% (DOF, 2003).

1.3 Problematiche ispettive relative ai prodotti alimentari d'importazione da Cina e Bangladesh

Lo sviluppo della Cina e del Bangladesh ha raggiunto livelli molto elevati coinvolgendo anche il settore delle produzioni alimentari. Questo aspetto si ripercuote non solo in ambito economico ma anche in ambito di sicurezza alimentare. Infatti, paradossalmente, l'aumento dei livelli di benessere, modernizzazione e incremento dei sistemi produttivi dei suddetti paesi sembrano addirittura elevare i rischi di salute pubblica in quanto tale processo di sviluppo non si sta evolvendo di pari passo con le buone pratiche di produzione e trasformazione degli alimenti. In particolare, per quanto riguarda la Cina il motivo principale che porta ai problemi riguardanti la sicurezza alimentare nel paese era la mancanza di leggi e regolamenti che disciplinano sia le produzioni che le pratiche di controllo (China Daily, 2005 e Banca asiatica di sviluppo, 2007); molti infatti sono i casi che hanno destato l'indignazione nazionale ed internazionale dei consumatori. Fra quelli più eclatanti nel 2002 viene scoperta la presenza di cloramfenicolo e residui di nitrofurani in molti generi alimentari di origine animale provenienti dalla Cina (http://www.aduc.it/comunicato/alimenti+cinesi+pericolosi_3811.php)(<http://www.acsi.ch/index.cfm?scheda=191>). Nel 2007 le autorità della Repubblica Dominicana hanno sequestrato 36 mila tubetti di dentifricio di provenienza cinese contenenti glicole etilenico (comunemente usato come antigelo) (http://www1.adnkronos.com/Archivio/AdnSalute/2007/05/24/Altro/SALUTE-USA-E-PECHINO-INDAGANO-SU-DENTIFRICIO-CINESE-CON-ANTIGELO_132721.php). L'episodio più discusso è avvenuto nel 2008 con lo scandalo alimentare cinese del latte alla melamina, che ha avvelenato quasi 300mila bambini e ne ha uccisi almeno sei (<http://www.repubblica.it/2009/01/sezioni/esteri/cina-latte-contaminato/cina-latte-contaminato/cina-latte-contaminato.html>). Questo scandalo ha accelerato le procedure per la stesura delle normative necessarie a soddisfare gli standard del *Codex Alimentarius* e dell'UE (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306919211000479>); il 28 febbraio del 2009, infatti, la Repubblica Popolare Cinese approvava il testo di legge sulla sicurezza alimentare (*Food Safety Law*), che pone interessanti quesiti riguardo alla possibilità di ritenere finalmente adempite le istanze che l'UE e la WTO rivolgono alla Cina al fine di tutelare la sicurezza dei consumatori e il libero scambio. Nonostante questo numerosi sono i recenti scandali relativi a svariati prodotti alimentari. Infatti le specifiche sull'esecuzione dei controlli ufficiali rimangono indefiniti e uno dei problemi principali rimane l'assenza di un piano di

ispezione in loco. Infatti nel 13 febbraio 2011 la *China State Council Food Safety Administration* ha dichiarato di aver sequestrato nel 2010 oltre duemila tonnellate di latte alla melamina (<http://www.ilfattoalimentare.it/cina-il-latte-alla-melamina-anche-nel-gelato-maxisequestro-svela-lennesima-frode.html>). Inoltre secondo il report annuale del RASFF, il numero di notifiche alla Cina nel 2014 è rimasto elevato (413 su un totale di 3.223 a livello globale), sebbene in lieve calo rispetto al 2012 e al 2013 (rispettivamente 536 e 436) (http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2014.pdf).

Anche il settore ittico ne viene colpito in maniera non indifferente: nel 2011 il governo cinese ha ordinato la chiusura di un'azienda che iniettava gelatina nei crostacei per aumentarne il peso, sequestrando 170 kg di prodotto (<http://www.asianews.it/notizie-it/Gamberetti-alla-colla,-nuovo-scandalo-alimentare-in-Cina-24000.html>); nel novembre del 2014 le autorità danesi segnalano la presenza di istamina in filetti di pesce importati dalla Cina per essere poi destinati oltre che al mercato interno anche a diversi paesi comunitari tra i quali l'Italia (<http://www.sicurezzaalimentare.it/sicurezza-alimentare/Pagine/TossinadiShigainformaggifrancesieistaminainfilettidipescecinesidestinatiaall enostretavole.aspx>); oppure la presenza di verde malachite comunemente usato dai rivenditori cinesi per ritardare il deterioramento dei prodotti ittici (<http://epochtimes.it/news/i-cibi-da-evitare-in-cina---125713>). Secondo il RASFF per quanto riguarda i prodotti ittici dal 2000 al 2015 sono state 25 le notifiche per interruzione della catena del freddo, 53 per presenza di sostanze proibite (di cui 8 per cloramfenicolo, 10 per verde malachite, 5 per nitrofurani, 24 per polifosfati, 2 per diossina, 4 per nitrito di sodio), 15 per accumulo di metalli pesanti, 1 per eccessiva presenza di istamina, 20 per infestazione da parassiti, 3 per presenza di batteri (mentre ne erano stati registrati 7 casi nel biennio '97-'98), 14 per presenza di residui farmacologici, 1 per tetrodotossina.

Per quanto riguarda il Bangladesh, l'ultimo aggiornamento in materia di legislazione alimentare risale all'ottobre del 2013 (*Safe Food Act*, 2013) che inasprisce i reati legati alla presenza di residui chimici nei prodotti alimentari (<http://www.dhakatribune.com/long-form/2013/dec/25/acts-parliament-2013>); non mancano comunque episodi potenzialmente nocivi per i consumatori: nel 2013 fu ritrovata un'eccessiva concentrazione di acido erucico nell'olio di due lotti di prodotti in salamoia e nell'olio di senape di provenienza bengalese (<http://www.alimenti-salute.it/notizie.php?sezionericerca=8&cercacategoria=0>); nel 2014 i controlli frontaliери evidenziarono il ritrovamento di escrementi di roditore in vari prodotti alimentari provenienti dal Bangladesh. Infine, un audit conclusosi nel febbraio del 2014 vieta l'importazione dal Bangladesh di foglie di betel (comunemente noto come foglie di *paan*)

poiché contaminati da un'ampia varietà di ceppi patogeni di *Salmonella*. Secondo il report annuale del RASFF (2014), le notifiche al Bangladesh sono state solo 20,(in calo comunque rispetto al 2013 in cui sono state 26 e rispetto al 2012 in cui sono state 56) (http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2014.pdf).

Per quanto riguarda i prodotti della pesca provenienti dal Bangladesh, nel portale RASFF sono presenti solo 4 notifiche inerenti il pesce, tutte risalenti al biennio 2010-11. Le notifiche riguardano soprattutto i gamberi ed i gamberetti. Infatti, per questi prodotti, il RASFF riporta tra il 2000 e il 2015 119 notifiche dovute a presenza di nitrofurano, 25 per la presenza di *Vibrio* spp., 8 per la presenza di *Salmonella* spp., 1 per la presenza di cloramfenicolo, 1 per la presenza di tossine stafilococciche e 1 per la presenza di ossitetraciclina. (http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2014.pdf).

CAPITOLO 2

La sicurezza alimentare nell'Unione Europea ed i controlli sui prodotti d'importazione a livello Europeo

2.1 Normativa comunitaria sulla sicurezza alimentare (Reg.178 e Pacchetto igiene)

Assicurare e garantire la libera circolazione di prodotti alimentari, sicuri dal punto di vista igienico sanitario, è un principio essenziale per il buon funzionamento del mercato interno europeo. Esistono tuttavia differenze sostanziali circa le legislazioni del settore alimentare negli Stati membri che possono impedire gli scambi commerciali (Colavita, 2012). Inoltre la globalizzazione dei mercati delle materie prime e dei prodotti alimentari, la generale tendenza all'applicazione di tecnologie sempre meno drastiche per ottenere prodotti più freschi, più nutrienti e più gustosi, l'evoluzione dell'interesse dei consumatori verso la salubrità degli alimenti (http://www.veterinariaalimenti.marche.it/viewdoc.asp?CO_ID=372) ha reso necessario definire a livello comunitario una base normativa comune e considerare come priorità strategica il raggiungimento degli standard più elevati possibili di sicurezza alimentare. Il presupposto essenziale fu quello di adottare un'impostazione che coinvolgesse tutta la filiera agro-alimentare (*farm to table approach*), passando quindi dalla produzione primaria, dalla trasformazione, dal trasporto, dalla distribuzione, dalla vendita, fino al consumo finale (<http://www.federalimentare.it/Documenti/RicercaNomismaFilieraAgroalimentare.pdf>). Il processo che ha permesso lo sviluppo della normativa comunitaria in vigore inizia con la stesura del Libro bianco sulla sicurezza alimentare del 1999. Il Libro bianco, consapevole della complessità della catena alimentare, inizia a strutturare i concetti di responsabilità affidata agli operatori del settore alimentare, di rintracciabilità, di trasparenza, di analisi del

rischio, del principio di precauzione; che verranno poi fissati e concretizzati nel Regolamento CE 178/2002 (“*General Food Law*”).

Pubblicato il 28 gennaio 2002, il Regolamento 178:

- “costituisce la base per garantire un livello elevato di tutela della salute umana e degli interessi dei consumatori in relazione agli alimenti, tenendo conto in particolare della diversità dell'offerta di alimenti compresi i prodotti tradizionali, garantendo al contempo l'efficace funzionamento del mercato interno. Esso stabilisce principi comuni e competenze, i mezzi per assicurare un solido fondamento scientifico, procedure e meccanismi organizzativi efficienti a sostegno dell'attività decisionale nel campo della sicurezza degli alimenti e dei mangimi”(Capo I, art.1, paragrafo 1);
- Si applica a tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti e anche dei mangimi prodotti per gli animali destinati alla produzione alimentare o ad essi somministrati (Capo II, art.4, paragrafo 1);
- Istituisce l'EFSA (European Food Safety Authority), coordina la valutazione dei rischi e identificare i rischi emergenti; fornisce consulenza scientifica e tecnica alla Commissione, anche nell'ambito delle procedure di gestione delle crisi; raccoglie e pubblica dati scientifici e tecnici nei settori della sicurezza alimentare; istituisce delle reti europee di organismi attivi nel settore della sicurezza alimentare;
- Ha un approccio integrato alla filiera e si basa sull'analisi del rischio;
- Definisce il principio di precauzione “Qualora, in circostanze specifiche a seguito di una valutazione delle informazioni disponibili, venga individuata la possibilità di effetti dannosi per la salute ma permanga una situazione d'incertezza sul piano scientifico, possono essere adottate le misure provvisorie di gestione del rischio necessarie per garantire il livello elevato di tutela della salute che la Comunità persegue, in attesa di ulteriori informazioni scientifiche per una valutazione più esauriente del rischio”(Capo II, art.7, paragrafo 1);
- Stabilisce se un alimento sia dannoso per la salute del consumatore tenendo conto delle condizioni d'uso normali, dell'informazione fornita al consumatore, del probabile effetto immediato o a lungo termine sulla salute, degli effetti tossici cumulativi, della sensibilità particolare di alcuni consumatori. Se un alimento a rischio fa parte di una partita, lotto o consegna di alimenti, si presume che tutti gli alimenti contenuti in quella partita, lotto o consegna siano a rischio

- Definisce i criteri di presentazione di ogni singolo prodotto alimentare “ l’etichettatura, la pubblicità e la presentazione degli alimenti o mangimi, compresi la loro forma, il loro aspetto o confezionamento, i materiali di confezionamento usati, il modo in cui gli alimenti o mangimi sono disposti, il contesto in cui sono esposti e le informazioni rese disponibili su di essi attraverso qualsiasi mezzo, non devono trarre in inganno i consumatori”(Capo II, art.16);
- Definisce i principi di rintracciabilità per tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti, dei mangimi, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime (<http://eurlex.europa.eu/legalcontent/IT/TXT/?uri=URISERV:f80501>).

Il quadro normativo europeo si completa con l’entrata in vigore nel gennaio del 2006 di quattro testi legislativi relativi ai requisiti igienico-sanitari e al sistema dei controlli ufficiali degli alimenti e dei mangimi, che compongono il cosiddetto “Pacchetto Igiene”. È costituito da:

Regolamento (CE) 852/2004, sull’igiene dei prodotti alimentari;

Regolamento (CE) 853/2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale;

Regolamento (CE) 854/2004, che stabilisce norme specifiche per l’organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano;

Regolamento (CE) 882/2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.

Ai fini degli argomenti trattati, due sono i regolamenti che entrano nel merito della sicurezza alimentare dei prodotti ittici, nella fattispecie:

Il Regolamento (CE) 853/2004 entra nel merito dei prodotti trasformati e non trasformati dei settori riguardanti: carni, molluschi bivalvi vivi, prodotti della pesca, latte crudo e prodotti lattiero-caseari, uova e ovoprodotti, cosce di rana e lumache, grasso animale fuso e ciccioli, stomaci, vesciche e intestini trattati, gelatina, collagene. Per quanto concerne i prodotti della pesca, questi vengono definiti come “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”. Nel Capitolo V ritroviamo le norme sanitarie per i prodotti della

pesca: sono sempre gli operatori del settore alimentare che garantiscono l'immissione di prodotti della pesca che soddisfino i requisiti relativi alle caratteristiche organolettiche dei prodotti della pesca, ai livelli di istamina e di azoto volatile totale, alla presenza di parassiti e tossine nocive per la salute umana.

Inoltre riporta norme specifiche riguardanti l'importazione di prodotti di origine animale da Paesi terzi: gli operatori del settore alimentare verificano che il paese terzo di spedizione figuri in un elenco (<http://www.agenziadoganemonopoli.gov.it/wps/wcm/connect/Internet/ed/Dogane/Operatore/Restituzioni+esportazione/Documentazione/Elenco+dei+Paesi+Terzi/>) di paesi terzi dai quali sono consentite le importazioni di tali prodotti e che lo stabilimento da cui il prodotto è stato spedito ed ottenuto o preparato figuri in un elenco (https://webgate.ec.europa.eu/sanco/traces/output/non_eu_listsPerActivity_it.htm#) di stabilimenti dai quali sono consentite le importazioni di tale prodotto, ove applicabile (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:it:PDF>);

Il Regolamento (CE) 854/2004 stabilisce norme specifiche circa i controlli ufficiali da effettuare sui prodotti della pesca nel rispetto dei requisiti relativi alle norme sanitarie presenti nel Reg.(CE) 853/2004.

Il "Pacchetto Igiene", un insieme di atti di origine comunitaria, emanati negli anni 2004-2005, ha riformato l'intera disciplina di settore, sostituendo le normative in merito prodotte negli anni precedenti e dando vita, come già previsto nelle linee guida contenute nel Libro bianco sulla sicurezza alimentare del 2000, a un sistema di regole organico e sistematico valido sia per il comparto alimentare che per quello mangimistico. Come visto, è costituito dal Reg. (CE) n. 178/02, in vigore dal gennaio 2005, il Reg. (CE) n.852/04 (in materia di igiene dei prodotti alimentari), Reg. (CE) n. 853/04 (alimenti di origine animale), Reg. (CE) n. 854/04 (controlli ufficiali), Reg. (CE) n. 882/04 e Reg. (CE) n. 183/05 (mangimi). Questi Regolamenti comunitari approfondiscono e precisano le tematiche della sicurezza alimentare e le modalità di applicazione del sistema di analisi dei rischi e dei punti critici di controllo (HACCP). Inoltre, l'applicazione del "Pacchetto Igiene" comporta l'abrogazione totale o parziale di numerose normative specifiche per diversi settori produttivi. Per quanto riguarda i prodotti importati da Paesi Terzi questi devono essere conformi a specifiche garanzie igienico-sanitarie stabilite dalla citata normativa comunitaria (trattate nello specifico nei tre

Reg. (CE) n. 853, 854 e 882 del 2004) che nell'insieme ne regolamentano l'importazione e il controllo (file:///C:/Users/M/Downloads/albisinni_diralim_2014_31_il_pacchetto_igiene.pdf).

2.2 Posti d'Ispezione Frontaliera (PIF)

L'UE è il più grande mercato per i prodotti della pesca e dell'acquacoltura d'importazione e nel 2010, con 5.336.189 tonnellate per un valore di 16,56 miliardi di euro ha assorbito il 40% del totale delle importazioni mondiali (http://www.europarl.europa.eu/atyourservice/it/displayFtu.html?ftuId=FTU_5.3.9.html). Per le merci provenienti da Paesi Terzi intervengono dei particolari organismi di controllo denominati Posti di Ispezione Frontaliera (PIF.); sono Uffici veterinari periferici del Ministero della Salute riconosciuti ed abilitati, secondo procedure comunitarie, ad effettuare i controlli veterinari su animali vivi, prodotti di origine animale e mangimi provenienti da Paesi terzi e destinati al mercato comunitario o in transito verso altri Paesi terzi con le modalità di cui alle direttive del Consiglio n. 97/78/CE e n. 91/496/CEE recepite rispettivamente con decreto legislativo 25 febbraio 2000, n°80 e decreto legislativo 3 marzo 1993, n. 93.

Complessivamente l'attività viene svolta, in relazione alle esigenze geografiche e commerciali, presso 13 aeroporti e 17 porti. Alcuni Uffici veterinari periferici risultano essere contemporaneamente posti di ispezione frontalieri portuale e aeroportuale, con un totale di 23 PIF.

Il quadro dei controlli all'importazione è completato dalla disciplina comunitaria relativa ai prodotti di origine animale introdotti dai Paesi Terzi a seguito di viaggiatore per il loro consumo personale (Reg. CE n. 206/2009 del 5 marzo 2009 e decreto ministeriale 10 marzo 2004 del Ministro della Salute di concerto con il Ministro dell'Economia e delle Finanze).

Il controllo fisico/materiale sulle partite introdotte risulta variare tra lo 0% ed il 100%. Il controllo fisico con percentuali pari al 100% sono normali per il controllo sulle partite di animali vivi. Le percentuali di controllo sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano sono stabilite dalla decisione della Commissione n. 94/360/CE del 20/5/1994 che prevede una riduzione dei controlli materiali sui prodotti di origine animale provenienti da Paesi terzi oggetto di armonizzazione comunitaria completa. Percentuali superiori a quelle previste dalla sopra citata decisione sono dovute ad attività di controllo effettuate in caso di sospette irregolarità o a misure di salvaguardia adottate dalla Comunità che impongono l'obbligo del controllo sistematico per alcune tipologie di prodotti. Quando ritenuto opportuno

dai veterinari ispettori, oppure in osservanza di specifiche disposizioni ministeriali o comunitarie, il controllo fisico o materiale viene integrato da un controllo di laboratorio. A seguito dei controlli veterinari sulle merci provenienti da Paesi terzi, le merci possono essere:

- importate in libera pratica nell'Unione Europea (UE);
- introdotte nell'UE sotto controllo doganale;
- respinte al di fuori del territorio dell'Unione Europea, distrutte o trasformate ai sensi del regolamento (CE) n.1774/2002 (in seguito sostituito dai Reg. (CE) n. 1069/2009 e n. 142/2011).

I respingimenti possono essere distinti, in base alle motivazioni che li hanno determinati, in tre categorie: respingimenti a seguito di controllo documentale, respingimenti a seguito di controllo di identità e respingimenti a seguito di controllo fisico o materiale che possono far seguito ad ispezione veterinaria o ad esame di laboratorio sfavorevole.

Nel 2011 sono state importate, attraverso i PIF. italiani, 58.753 partite di animali, prodotti di origine animale e mangimi da oltre 100 Paesi terzi con un decremento del 5,1% rispetto all'anno precedente. I prodotti della pesca con 41.533 partite (67,1%) rappresentano il gruppo merceologico più numeroso seguito dalle carni con 6.103 partite (9,9%), dagli animali vivi con 4.008 partite (6,5%), pelli con 2.214 partite (3,6%), altri. In particolare il settore dei prodotti della pesca rileva un'elevata incidenza per i respingimenti (<http://www.salute.gov.it/resources/static/uffici/RelazionePIF2011.pdf>).

CAPITOLO 3

Comunità etniche cinesi e bengalesi presenti in Italia

3.1 Comunità cinesi

Quello cinese rappresenta senza dubbio uno dei più importanti flussi migratori nel panorama internazionale (Campani *et al.*, 1992); il fenomeno, le cui origini risalgono ad oltre due secoli fa, si è perpetuato nel tempo ed ha interessato, con tempistiche ed entità diverse, pressoché tutti i continenti. A partire dalla seconda metà del XX secolo fino ai nostri giorni i flussi sono notevolmente incrementati ed i cosiddetti “*Chinese overseas*”, (cinesi d’oltremare) si aggirerebbero oggi intorno ai 35-40 milioni di individui, distribuiti in 130 paesi diversi. I paesi del Sud-Est asiatico hanno rappresentato la prima meta del flusso migratorio cinese verso l’estero già a partire dalla seconda metà dell’Ottocento e attualmente la comunità cinese nei paesi del Sud-Est asiatico, pur minoritaria in termini demografici rispetto alle altre etnie, rappresenta molto spesso l’élite economico-finanziaria che controlla oltre il 70% dei capitali e che è stata alla base dello sviluppo industriale ed imprenditoriale di questi Stati (De Giorgi, 2002). Nello stesso periodo ebbe inizio il fenomeno migratorio verso il continente americano, attratti da opportunità lavorative rappresentate dalle miniere in California, dallo scavo del Canale di Panama e dalla costruzione della ferrovia transamericana negli USA. In America gli emigrati cinesi sono stati in passato oggetto di politiche razziali restrittive, si ricordi a tal proposito la Legge d’Esclusione Cinese del 1882, che ridusse rapidamente il flusso d’ingresso annuale da 40.000 unità registrate nello stesso anno fino a 10 unità registrate nel 1887 (Waldinger & Tseng, 1992). Questa legge fu abolita solo durante il secondo conflitto mondiale nel 1943 a seguito dell’alleanza antisovietica tra USA e Cina, e da allora è stata concessa ai cinesi la possibilità di emigrare in America; con l’*Immigration Act* del 1965 la quota fu innalzata a 20.000 unità l’anno (De Giorgi, 2002). Attualmente la comunità cinese del Nord-America è una delle più consistenti e conta circa 3.800.000 individui di terza e

quarta generazione, naturalizzati come cittadini americani (Campani, Carchedi & Tassinari, 1994).

Una terza area molto importante per le migrazioni cinesi sono state le isole del Pacifico, in particolare le Hawaii e l'Australia. In quest'ultima si è verificata una situazione analoga a quella americana, con flussi migratori notevoli durante la fase della "corsa all'oro" nelle miniere (1850) ed una successiva politica restrittiva e di regolazione degli ingressi (1880) protrattasi fino alla seconda guerra mondiale.

L'Europa fino al XX secolo non era stata toccata dalla migrazione cinese se non in misura marginale. Le poche centinaia di cinesi presenti provenivano dalle colonie inglesi e francesi e risiedevano soprattutto a Londra, Liverpool e a Parigi dove lavoravano come marinai o mozzi sulle navi mercantili (De Giorgi, 2002). In occasione del primo conflitto mondiale, in cui la Cina si schierò a fianco di Gran Bretagna e Francia, si registrò un nuovo afflusso di manodopera cinese nei Paesi alleati, reclutati per lavorare nelle fabbriche di armi e nello scavo di trincee, provenienti dalla provincia dello Zhejiang. Al termine del conflitto alcuni scelsero di fermarsi, impiegandosi nelle fabbriche o dedicandosi all'artigianato. Delle 10.000 unità di cinesi registrate in Europa in quegli anni, 3.000 erano distribuite in Francia, 1.000 tra Paesi Bassi, Austria e Italia, 300 in Spagna, 300 in Belgio e circa 200 in Portogallo (AA.VV., Cina a Milano, Abitare Segesta, Milano, 1997). Da questi si ebbe la creazione di comunità stabili nelle varie metropoli Europee, a Gare de Lyon a Parigi, nel quartiere Sempione a Milano, Amsterdam e Rotterdam (Campani, Carchedi & Tassinari, 1994). Alla fine della Seconda Guerra Mondiale molti cinesi autoctoni arrestarono la loro corsa alla migrazione. Uno dei principali motivi fu il blocco dell'emigrazione attuato dalla Repubblica Popolare Cinese nel 1949, anno della sua creazione. Quest'ultima aveva, infatti, assunto una posizione fortemente discriminatoria nei confronti dei cinesi d'oltremare e riteneva un traditore della patria chiunque volesse migrare. Solo alla morte di Mao Zedong e al nuovo governo di Deng Xiaoping si ebbero cambiamenti economico-politici all'interno della Repubblica Popolare Cinese che sfociarono in una politica di apertura verso l'estero. Ciò determinò in un periodo compreso tra la fine degli anni Settanta e gli anni Ottanta un imponente flusso migratorio. (Ceccagno, 2003). Solo in Francia, dopo il 1975, i cinesi raggiunsero nel giro di poco tempo le 150.000-200.000 unità, dando vita alla formazione delle *Chinatowns*, la più importante delle quali si trova oggi a Parigi.

In Italia le prime tracce di una presenza cinese risalgono agli anni Trenta, a Milano; si trattava per la maggior parte di migranti che già si trovavano in Europa, in particolare in Francia, e che si trasferirono nella città lombarda impegnandosi soprattutto nell'artigianato tessile.

Originari della provincia dello Zhejiang, area strategica dal punto di vista economico commerciale in quanto “città costiera aperta” finalizzata a favorire “operazioni connesse al commercio estero” (Bertinelli, 1990), attivarono catene migratorie a carattere familiare, motivo per il quale restano tuttora il gruppo che si è affermato meglio e che rappresenta la maggior parte dei cinesi nel nostro territorio (De Giorgi, 2002). Fino agli anni Settanta-Ottanta la presenza di comunità cinesi era limitata solo a Torino e appunto a Milano.

Solo alla fine degli anni Ottanta il flusso migratorio divenne imponente, quando venne indotta la prima sanatoria per i lavoratori stranieri irregolari, che promuoveva la regolarizzazione e legalizzazione del rapporto di lavoro con lavoratori extracomunitari privi di regolare permesso di soggiorno (art.4 dell Legge n.943, 30 dicembre 1986 art. 2 della Legge n.39, 28 febbraio 1990). Da quel momento in poi si è assistito ad una crescita costante fino al 1990, anno in cui vennero concesse la regolarizzazione e la legittimazione del lavoro autonomo. Secondo dati ufficiali la comunità cinese in Italia ammontava a 1.500 unità nel periodo antecedente al 1986, per poi crescere e raggiungere le 9.880 unità dopo tale anno, fino ad arrivare alle 19.237 unità nel 1990. Nel 1993 il numero raggiunse le 22.875 unità (Campani, Carchedi & Tassinari, 1994). Oltre agli immigrati provenienti dallo Zhejiang arrivarono in Italia anche i cinesi provenienti dal Fujian, la provincia che si trova appena al di sotto dello Zhejiang.

Ad oggi i cittadini cinesi rappresentano la terza comunità straniera in Italia; tra il 2003 e il 2009 si è registrato un aumento demografico di oltre l’80% (De Giorgi, 2002) con un totale di 188.352 cinesi nel 2010 (Dossier Statistico Immigrazione, Caritas-Migrantes, 2010) e di 320.794 nel 2014 (LA COMUNITÀ CINESE IN ITALIA, 2014).

Tutte le comunità cinesi insediatesi nei vari paesi presentano essenzialmente la stessa tipologia di organizzazione che le differenzia dalle altre collettività, ossia la realizzazione di una realtà fondata sull’importanza della famiglia e delle reti parentali. Quando il migrante arriva in Italia, infatti, viene immediatamente inserito in un contesto lavorativo da parte di un connazionale (di solito un parente), che si preoccupa anche di “fornire vitto e alloggio, accogliendo in casa il nuovo individuo”. Si viene dunque a creare una forte corrispondenza tra i valori familiari e quelli produttivi: si parla infatti di “familismo imprenditoriale” in cui avviene un forte interconnessione tra tempo di vita e di lavoro, che si realizza anche tramite la contiguità fisica tra casa e luogo di lavoro (che spesso coincidono). Questo tipo di forma organizzativa non ha riscontro in nessun altro gruppo nazionale del nostro paese (Campani, Carchedi & Tassinari, 1994). La maggior parte dei cinesi in Italia sono inseriti dal punto di vista lavorativo nel commercio al dettaglio, come titolari o come dipendenti. Si tratta soprattutto di piccoli negozi, che vendono principalmente abbigliamento e confezioni, in cui

sono impiegati marito, moglie ed alcuni dipendenti, generalmente parenti dei titolari. Gran parte della merce venduta al dettaglio proviene dalla Cina, attraverso una fitta rete di grossisti, cinesi o italiani, che importano la merce in Italia. Molte ditte che si occupano di importazione all'ingrosso hanno sede a Milano, o nelle città portuali di Genova e Napoli; le consegne ai titolari dei negozi avvengono per la maggior parte via terra, attraverso ditte di trasporto italiane ("La comunità cinese a Trieste. Dinamiche imprenditoriali tra ristoranti e pronto moda", 2005). Il settore manifatturiero legato ai prodotti tessili e all'abbigliamento si occupa per il 70% delle confezioni di articoli di vestiario e per il 30% della lavorazione del cuoio e delle pelli (CCIAA, 2003). Molti esercenti si riforniscono, in questo caso, nelle aree produttive del pratese, dove la disponibilità di suddetti prodotti è ampia ("La comunità cinese a Trieste. Dinamiche imprenditoriali tra ristoranti e pronto moda", 2005).

La ristorazione è stata invece il settore che ha permesso una prima stabilità territoriale ed economica agli immigrati cinesi insediatisi in Italia, i quali hanno messo a frutto la loro ricca tradizione gastronomica e dato vita a moltissimi ristoranti "esotici" che hanno incontrato il gusto crescente della popolazione autoctona, soprattutto a partire dai primi anni Novanta. Benchè le città che presentano un maggior numero di punti di ristorazione cinese rimangono quelle che, come Milano (che oggi conta oltre duecento locali di questo tipo), furono i primi luoghi di insediamento degli immigrati, attualmente si possono ritrovare in tutta Italia (Redi, 2007). C'è da dire che il punto di forza di tali esercizi è il prezzo molto accessibile, che consente loro di affermarsi ed essere competitivi nei confronti della ristorazione italiana. D'altro canto l'importazione illegale di prodotti provenienti dalla Cina, la mancata tracciabilità dei prodotti alimentari, l'utilizzo di prodotti congelati spacciati per freschi e l'apertura di locali in assenza della prescritta notifica all'Autorità Sanitaria (Comando Carabinieri per la Tutela della Salute, 2011/2012) sono le infrazioni più comuni riscontrabili in questi esercizi.

La peculiarità degli immigrati cinesi nell'attivare e gestire aziende in grado di offrire lavoro ai connazionali, fa sì che essi abbiano presentato una distribuzione abitativa tendente alla concentrazione: la presenza cinese sull'intero territorio nazionale ha quindi un carattere prevalentemente urbano, come si registra anche negli altri paesi europei (Revue Européenne des Migrations Internationales, 1992). In Italia le principali comunità si trovano al Nord e al Centro; a Milano con concentrazione soprattutto nella zona di via Sarpi, a Roma nella zona di piazza Vittorio, a Firenze e a Prato. In quest'ultima si registra la concentrazione maggiore di cinesi rispetto alla popolazione locale, infatti i cinesi residenti costituiscono oltre il 20% dell'intera popolazione pratese.

3.2 Comunità bengalesi

Il Bangladesh ha da sempre rappresentato uno snodo fondamentale delle rotte commerciali che partendo dall'Europa connettevano fittamente i porti dell'Africa orientale alla Cina e agli arcipelaghi indonesiani (Van Schendel, 2009). In questo contesto lo slancio verso le terre d'oltremare nella seconda parte del ventesimo secolo darà forma a processi migratori di inedite proporzioni. A partire dal XVI secolo, con l'arrivo dei portoghesi prima e quindi degli olandesi, dei francesi e degli inglesi, non furono più solo i commercianti a varcare gli oceani attraverso i vettori commerciali. Le flotte dei nascenti imperi coloniali occidentali presero infatti a reclutare nei porti indiani e dalle province bengalesi i cosiddetti "*lashkar*" o "*probashi*" (sono i termini con i quali vengono indicati rispettivamente i marinai asiatici e africani che prestavano servizio sulle imbarcazioni delle flotte mercantili europee e gli emigrati d'oltremare bengalesi, altrimenti chiamati *londoni*, da Londra, sede della più consistente collettività bangladesese all'estero o, più raramente, *bideshi*, letteralmente "abitante all'estero"). L'introduzione dei motori a vapore rese la presenza dei *lashkar* sulle imbarcazioni inglesi pressoché indispensabile poiché il personale europeo mal sopportava il lavoro nelle sale macchine, a causa delle temperature disumane che si sviluppavano al loro interno, e soprattutto non era disposto ad accettare i miseri salari di cui si accontentavano i marinai asiatici. Il contributo dell'attuale Bangladesh all'insieme dei *lashkar*, benché difficilmente quantificabile, era di grande rilievo. I bengalesi delle province del Sylhet, di Noakhali e di Chittagong, che soggiornavano a Calcutta in attesa di un impiego, ingrossarono progressivamente le fila della marina mercantile britannica e formarono in un secondo momento le prime teste di ponte dell'emigrazione oltremare, dedicandosi allo "*ship jumping*". Con questa espressione veniva chiamata fra i marinai la pratica di scappare dalla nave, rinunciando ai compensi non ancora corrisposti, per sperimentare la vita sulla terraferma. Al termine delle guerre napoleoniche (1815) i *lashkar* presenti a Londra erano non meno di 1.100; si andava così formando una piccolissima collettività di ex-marinai bengalesi e indiani ormai stanziali. I primi emigranti erano maschi in età lavorativa e quando non avevano un posto dove dormire vivevano in pensioni, tuguri e scantinati sovraffollati. Fra il 1935 e il '45 la moda di saltare giù dalle navi conobbe un'improvvisa diffusione e il numero dei bengalesi presenti a Londra prese a crescere (Adams, 1994).

Il periodo bellico offrì delle inaspettate opportunità a questi avventurosi lavoratori. Fra il 1940 e il '45 infatti le industrie della Greater London e delle Midlands cominciarono ad aprire le loro porte alla manodopera immigrata. I più risoluti a trovare un impiego cominciarono così

ad allontanarsi da Londra verso Bradford, Birmingham, Coventry, Liverpool e Bristol, inserendosi progressivamente nell'industria tessile e nel settore metallurgico (Siddiqui, 2004; Eade *et al.*, 2006; Choudhury, 1993).

L'Europa è sempre stata percepita come una destinazione di prestigio per i bengalesi, attratti da Paesi come Germania, Francia, Svizzera, Belgio, Olanda, Norvegia, Svezia e Finlandia che offrivano asilo politico per periodi relativamente lunghi, e attratti dalla "facilità d'entrata" dei Paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo, Italia compresa, sprovvisti di politiche efficaci sull'immigrazione fino al 1980 (King & Rybaczuk, 1993).

In Italia la prima meta bengalese è stata Roma; nella capitale nel giro di pochi mesi tra la fine del 1989 e la metà del 1990, un piccolo gruppo di circa 200-300 bengalesi è aumentato di circa venti volte fino a diventare la più grande comunità del Bangladesh in Europa. La popolazione è poi raddoppiata attraverso l'immigrazione clandestina che ha permesso l'ingresso di circa 10.000 bengalesi. La legislazione italiana regola i flussi migratori clandestini attraverso due norme. Nel 1986 entra in vigore la legge n.943, 30 dicembre 1986 (Norme in materia di collocamento e di trattamento dei lavoratori extracomunitari immigrati e contro le immigrazioni clandestine) che, in attuazione della convenzione dell'OIL n. 143 del 24 giugno 1975, garantisce a tutti i lavoratori extracomunitari legalmente residenti nel suo territorio e alle loro famiglie parità di trattamento e piena uguaglianza di diritti rispetto ai lavoratori italiani e garantisce inoltre i diritti relativi all'uso dei servizi sociali e sanitari, al mantenimento dell'identità culturale, alla scuola e alla disponibilità dell'abitazione, nell'ambito delle norme che ne disciplinano l'esercizio ([http://www.stranieriinitalia.it/briguglio/immigrazione-e-asilo/1992/luglio/legge-943-](http://www.stranieriinitalia.it/briguglio/immigrazione-e-asilo/1992/luglio/legge-943-86.html)

86.html). Purtroppo, la norma ha determinato un incremento del lavoro nero, poichè i datori di lavoro sono stati riluttanti a regolarizzare il permesso di soggiorno degli immigrati perché avrebbero dovuto pagare salari più alti e garantire benefici sociali, mentre i bengalesi erano riluttanti a formalizzare il loro status per paura di essere licenziati. Ciò ha determinato che solo 118.700 immigrati hanno usufruito pienamente della nuova normativa. Nel 1990 la legge 28 febbraio 1990, n. 39, intesa legge Martelli, si presenta formalmente come provvedimento in materia di rifugiati e profughi, argomento principale del testo di legge, che in effetti amplia e definisce lo status di rifugiato e il diritto di asilo politico a esso collegato; si pone inoltre come un tentativo, per quanto tardivo, di regolamentare l'aumento esponenziale dei flussi migratori degli anni '80, mediante programmazione statale dei flussi di ingresso degli stranieri non comunitari in base alle necessità produttive e occupazionali del Paese e introduce per la prima volta pene detentive e pecuniarie, aggravate dalla circostanza del concorso per

delinquere. La Legge Martelli ha favorito il processo di un movimento già in corso e ha dato luogo a tre processi di immigrazione distinte:

- migrazione familiare o parentale: i bengalesi entrano in Italia per unirsi a parenti già stabilitisi (fratelli, zii, cugini, figli e, in alcuni casi, mogli);
- migrazione opportunistica: i bengalesi con permessi di soggiorno temporanei si spostano da un Paese all'altro in modo da ottenere un soggiorno permanente in Europa. Questo era il principale meccanismo di migrazione dei Bengalesi in Italia;
- “*Adam bepari*” (Osmani, 1986): cioè il “business del traffico umano” che si realizza attraverso “agenzie di viaggio” che riconoscono l'Italia come un nuovo lucroso territorio per lo sfruttamento immediato (Knights, 1996).

Infine con la legge Turco-Napolitano e soprattutto con la legge Bossi-Fini la tendenza è stata quella di rendere più difficoltoso l'ingresso e il soggiorno regolare dello straniero, agevolarne l'allontanamento e riformare in senso restrittivo la disciplina dell'asilo. (http://www.rivistapaginauno.it/la_schizofrenia_dell'accoglienza.php).

Ad oggi l'Italia rappresenta la seconda meta europea della migrazione bengalese. Il modello migratorio della comunità si caratterizza per una netta maggioranza di presenze maschili, il 70,4%, rispetto alle donne, il 29,6%, (basti pensare che nel '92 era di genere femminile solo il 3% dell'intera comunità), ciò rivela una polarizzazione di genere più marcata degli immigrati provenienti dagli altri Paesi dell'Asia centro meridionale (uomini: 61,8%; donne: 38,2%) e dal continente asiatico nel suo complesso (uomini: 55%; donne: 45%). Tale caratteristica va tuttavia attenuandosi, ora che la comunità inizia a mostrare segni di un progressivo consolidamento sul territorio con un incremento del numero dei minori e di soggiornanti di lungo periodo. I Bengalesi rappresentano la decima comunità per numero di presenze tra i cittadini non comunitari e la quarta comunità proveniente dal continente asiatico. Nel 2014, i migranti di origine bengalese regolarmente soggiornanti in Italia risultano 115.301, pari al 3% del complesso dei non comunitari in Italia. Le prime tre regioni di insediamento sono: Lazio (26%), Veneto (18,9%) e Lombardia (18,6%). La maggior parte dei permessi di soggiorno a scadenza di cui sono titolari cittadini bengalesi sono legati a motivi di lavoro, che raggiungono un'incidenza del 67,8%, di questi il 53,5% permessi per soggiornanti di lungo periodo, mentre il 46,5% sono soggetti ad essere rinnovati, proporzioni analoghe a quelle rilevate sul totale dei cittadini non comunitari presenti nel Paese. I minori rappresentano il 24,3% e gli alunni di origine bengalese nell'anno scolastico 2011/2012 sono 11.662 ed occupano il tredicesimo posto nella graduatoria delle nazionalità non comunitarie per numero di studenti inseriti nel circuito scolastico italiano. Il tasso di occupazione è del 59%. Nel 2012,

i lavoratori bengalesi con un rapporto di lavoro dipendente sono quasi 44 mila; la maggior parte (30 mila) ha sottoscritto un contratto a tempo indeterminato, mentre circa 11.000 risultano impiegati a tempo determinato. (La Comunità Bengalese in Italia, 2013).

CAPITOLO 4

Frodi nel comparto alimentare

4.1 Frodi sanitarie e commerciali

Le frodi, nate insieme alle prime forme di attività commerciali, sono una delle attività criminose più antiche dell'umanità e sono saldamente radicate nella vita sociale. Nel momento in cui il denaro è diventato l'indicatore del valore delle merci fu logico che i commercianti aumentassero il proprio profitto vendendo a prezzo più elevato merci meno pregiate. Celebre è l'aneddoto dell'orefice (Vitruvio, "De architettura", 23 a.C.) che preparò la corona per Gerone di Siracusa e cercò di ingannare il suo cliente mescolando all'oro metalli meno pregiati e ci volle Archimede per svelare la frode che, con l'ingegno che lo rese famoso in tutto il mondo, inventò il metodo per la misura del peso specifico dei corpi. Plinio, nella sua "Storia naturale", racconta di commercianti che adulteravano alimenti, droghe, spezie, soprattutto quelli che arrivavano a Roma da paesi lontani, e indica vari metodi per svelare le frodi. E però grazie alla cultura araba che la lotta alle frodi viene affrontata con metodo scientifico; fu istituito un sistema di polizia, di controlli e di tribunali contro le frodi data l'esigenza di far rispettare le leggi e i divieti che i precetti della religione islamica imponevano. Gli anni d'oro delle frodi alimentari si ebbero, però, con l'avvento del capitalismo. Dal 1700 in avanti il proletariato poteva essere sfruttato non solo in fabbrica, con bassi salari e condizioni disumane di lavoro, ma anche nella bottega; è durante questo periodo infatti che si moltiplicarono i casi, soprattutto in Inghilterra, di adulterazioni in particolare del pane e del vino (Stieb & Sonnedecker, 1966). Il medico Arthur Hassall (1817-1894), nominato direttore del primo laboratorio governativo di controllo per la repressione delle frodi alimentari, ebbe nella battaglia contro le frodi un ruolo di spicco e a lui e ai suoi collaboratori si deve nel 1860, l'"*Adulteration of Food Act*", la prima legge inglese contro le frodi (<http://www.rsc.org/education/eic/issues/2005Mar/Thefightagainstfoodadulteration.asp>). La corsa veloce e gloriosa dell'industrializzazione paleocapitalistica è costellata di "progressi" tecnici accompagnati da un peggioramento della qualità, da frodi, da contaminazioni e pericoli per la salute. In Inghilterra sarebbe stato necessario attendere il 1875 per avere la

prima legge organica contro le frodi, il “*Sale of food and drug Act*” che risulta essere tuttora la base della moderna legislazione alimentare anglosassone.

La storia delle frodi alimentari in Italia è ancora in gran parte da scrivere. Alla fine dell’Ottocento si andava dal vino fabbricato senza uva al formaggio che non conteneva nemmeno una goccia di latte (Sorcinelli, 1999). In Italia le prime norme risalgono al 1888, con la legge Crispi-Pagliani, con la quale si istituì il Sistema Sanitario Nazionale e la tutela della salute dei cittadini divenne un dovere dello Stato; seguì il Testo Unico delle leggi sanitarie del 1907 ed il relativo regolamento del 1908 (<http://www.vetesc.unimi.it/stuff/rassegna/2/semeraro.pdf>). La vasta riforma delle leggi merceologiche che si ebbe sotto il fascismo negli anni dal 1928 al 1935 non assicurò merci migliori al minimo prezzo ai cittadini e ai lavoratori, ma fece gli interessi degli agricoltori o degli industriali. La condizione naturalmente si aggravò drasticamente durante i periodi di guerra. Comunque, le leggi del Duce sugli alimenti sono rimaste in vigore fino alla fine degli anni cinquanta del Novecento. Per quindici anni, dopo la fine della seconda Guerra Mondiale, la tecnologia dell’industria agroalimentare ha fatto grandi progressi, nel bene e nel male, ma le leggi hanno fatto finta di non accorgersene. Sfortunatamente, dopo l’ondata di indignazione e di protesta della fine degli anni cinquanta, l’attenzione dell’opinione pubblica si è allentata anche se negli anni 60 e settanta del Novecento le frodi, naturalmente, sono continuate (raggiungendo il culmine con lo scandalo del vino al metanolo nell’aprile del 1986). Solo dopo diciotto anni e una mobilitazione popolare, con raccolte di firme e proteste varie, si riuscì ad ottenere l’emanazione del regolamento che stabilisce le informazioni che devono essere presenti nelle etichette dei prodotti alimentari. La storia delle nostre leggi contro le frodi degli alimenti, dagli anni settanta in avanti, coincide con quella delle leggi della Comunità Europea, comunque recepite con ritardi, ostacoli, modificazioni (http://www.fondazionemicheletti.it/altronevecento/articolo.aspx?id_articolo=12&tipo_articolo=d_saggi&id=139).

In senso generico, con il termine “frode alimentare” si indica la produzione, detenzione, commercio, vendita o somministrazione di alimenti non conformi alle leggi vigenti. Spesso si usano indistintamente i termini di frode e truffa per definire un comportamento illecito che si sostanzia in una parte lesa, che è stata ingannata, raggirata subendo un danno economico o un danno alla persona. In realtà non sono sinonimi. Il delitto di truffa si distingue da quello di frode in commercio per l’esistenza del raggiro o dell’artificio (<http://www.vetesc.unimi.it/stuff/rassegna/2/semeraro.pdf>). Secondo i più recenti orientamenti

giurisprudenziali, in relazione alla produzione ed alla vendita dei prodotti alimentari, si è soliti distinguere tra due forme di inganno: la frode sanitaria e la frode commerciale.

4.1.1 Frodi sanitarie

Il presupposto della frode sanitaria è insito nella probabilità o certezza di procurare un danno alla salute dei cittadini, di rendere potenzialmente o sicuramente nocive le derrate alimentari (http://www.salute.gov.it/resources/static/ministero/usmaf/Polizia_Sanitaria_aprile_2010/NA_S_Frodi_adulterazione_alterazione_contraffazione_pericolosita_nocivita_USMAF.pdf). Le frodi sanitarie possono essere commesse da “*chiunque detiene per il commercio o pone in commercio o distribuisce per il consumo acque, sostanze o cose da altri avvelenate, adulterate o contraffatte in modo pericoloso per la salute pubblica*” (artt. 442 e 444 del Codice Penale). Il reato si configura anche se si tratta di distribuzione gratuita. Il Codice penale (titolo VI – Dei delitti contro l’incolumità pubblica; Capo II – Dei delitti di comune pericolo mediante frode) regola, dal punto di vista normativo, le frodi sanitarie, e in particolare:

- Art. 438 c.p. **Epidemia**

“Chiunque cagiona un’epidemia mediante diffusione di germi patogeni è punito con l’ergastolo. Se dal fatto deriva la morte di più persone, si applica la pena di morte” (abolita con l’art. 1 del D.Lgs. n. 224 del 10 agosto 1944).

- Art. 439 c.p. **Avvelenamento di acque o di sostanze**

“Chiunque avvelena acque o sostanze destinate all’alimentazione prima che siano attinte o distribuite per il consumo è punito con la reclusione non inferiore a 15 anni. Se dal fatto deriva la morte di alcuno, si applica la pena dell’ergastolo”.

- Art. 440 c.p. **Adulterazione e contraffazione di sostanze alimentari**

“Chiunque corrompe o adultera acque o sostanze destinate all’alimentazione, prima che siano attinte o distribuite per il consumo, rendendole pericolose alla salute pubblica, è punito con la reclusione da tre a dieci anni. La stessa pena si applica a chi contraffà, in modo pericoloso alla salute pubblica, sostanze alimentari destinate al commercio. La pena è aumentata se sono contraffatte o adulterate sostanze medicinali”:

- Art. 442 c.p. **Commercio di sostanze alimentari contraffatte e adulterate**

“Chiunque, senza essere concorso nei reati preveduti dai tre articoli precedenti, detiene per il commercio, ovvero distribuisce per il consumo acque, sostanze o cose che sono state da altri avvelenate, corrotte, adulterate o contraffatte in modo pericoloso alla salute pubblica, soggiace alle pene rispettivamente stabilite nei detti articoli”.

- **Art. 444 c.p. Commercio di sostanze alimentari nocive**

“Chiunque detiene per il commercio, pone in commercio ovvero distribuisce per il consumo sostanze destinate all'alimentazione, non contraffatte né adulterate, ma pericolose alla salute pubblica, è punito con la reclusione da sei mesi a tre anni e con la multa non inferiore a 51 euro. La pena è diminuita se la qualità nociva delle sostanze è nota alla persona che le acquista o le riceve”.

Quando si parla di frodi sanitarie è indispensabile specificare i concetti di pericolosità e nocività poiché fanno riferimento a diverse normative.

Per nocività si intende l'attitudine che ha una sostanza alimentare di creare un danno alla salute di chi la consuma. La pericolosità, in questo caso, non è data dalla ipotetica ed astratta possibilità di nocimento, ma dall'attitudine concreta e già immanente nel prodotto di provocare un danno alla salute se consumato nelle condizioni in cui in quel momento si trova (http://www.salute.gov.it/resources/static/ministero/usmaf/Polizia_Sanitaria_aprile_2010/NA_S_Frodi_adulterazione_alterazione_contraffazione_pericolosita_nocivita_USMAF.pdf). Qui vengono applicate le suddette norme del Codice Penale con l'aggiunta degli artt. 515, 516 e 517.

Invece, per pericolosità si intende la potenziale attitudine di una sostanza alimentare a cagionare un danno alla salute. E' la probabilità che il danno alla salute si verifichi. In questo caso si fa riferimento alla Legge 283/63 che punisce violazioni concernenti l'integrità e la purezza dei prodotti alimentari (http://www.salute.gov.it/resources/static/ministero/usmaf/Polizia_Sanitaria_aprile_2010/NA_S_Frodi_adulterazione_alterazione_contraffazione_pericolosita_nocivita_USMAF.pdf); inoltre, si applica anche il “principio di precauzione” contenuto nell'art. 7 del Regolamento CE 178/2002 (qualora, in circostanze specifiche a seguito di una valutazione delle informazioni disponibili, venga individuata la possibilità di effetti dannosi per la salute ma permanga una situazione d'incertezza sul piano scientifico, possono essere adottate le misure provvisorie di gestione del rischio necessarie per garantire il livello elevato di tutela della salute che la Comunità persegue, in attesa di ulteriori informazioni scientifiche per una valutazione più esauriente del rischio).

4.1.2 Frodi commerciali

Comprendono tutte le azioni fraudolente sugli alimenti o sulle loro confezioni che, pur non determinando concreto o immediato nocimento per la salute pubblica, favoriscono illeciti

profitti a danno del consumatore. Esse si manifestano attraverso l'apposizione di mendaci messaggi, presentazioni o pubblicità di prodotti alimentari e nella falsificazione delle informazioni presenti sull'etichetta (De Giovanni, 2005). Anche in questo caso interviene il Codice Penale (titolo VIII – Dei delitti contro l'economia pubblica, l'industria e il commercio; Capo II – Dei delitti contro l'industri ed il commercio), e nello specifico:

- **Art. 515 c.p. Frode nell'esercizio del commercio**

“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, è punito, qualora il fatto non costituisca un più grave delitto, con la reclusione fino a due anni o con la multa fino a 2.065 euro. Se si tratta di oggetti preziosi, la pena è della reclusione fino a tre anni o della multa non inferiore a 103 euro”.

- **Art. 516 c.p. Vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine**

“Chiunque pone in vendita o mette altrimenti in commercio come genuine sostanze alimentari non genuine è punito con la reclusione fino a sei mesi o con la multa fino 1.032 euro”.

È importante sottolineare che nella frode commerciale, rispetto a quella sanitaria il reato si consuma alla “consegna all'acquirente” e non “nel porre in commercio” come specificato nell'art. 444 del Codice Penale.

Tracciare un confine netto tra i due tipi di frodi, commerciali e sanitarie, è assai difficile in quanto nella maggior parte dei casi i due fenomeni sono coesistenti. Inoltre possiamo distinguere frodi sulla qualità intrinseca del prodotto e frodi riguardanti la commercializzazione degli alimenti.

Frodi sulla qualità intrinseca del prodotto.

- **Alterazioni:** sono fenomeni solitamente accidentali, che portano a modifiche della composizione e delle caratteristiche organolettiche di un prodotto alimentare, con depauperamento o ripercussioni negative anche sulle caratteristiche nutrizionali, in genere dovute a una cattiva conservazione degli alimenti ;
- **Adulterazioni:** Sono modifiche della naturale composizione di un prodotto alimentare, dovute ad aggiunta o sottrazione volontaria e non dichiarata di alcuni componenti, allo scopo di ottenere un tornaconto economico. In alcuni casi è una frode con riflessi negativi sia di tipo commerciale che nutrizionale; in altri casi l'adulterazione può esporre il consumatore a rischi per la salute per l'innescarsi di reazioni allergiche;

- **Sofisticazioni:** sono modifiche volontarie della naturale composizione di un prodotto alimentare mediante l'aggiunta di sostanze estranee, o la sostituzione di uno o più elementi propri dell'alimento con sostanze di qualità e valore inferiore, o mediante l'aggiunta di sostanze chimiche non consentite dalle leggi, al fine di migliorarne l'aspetto o per coprirne i difetti.

Frodi riguardanti la commercializzazione degli alimenti

- **Falsificazioni:** sono operazioni fraudolente che consistono nella sostituzione di un alimento per un altro (*aliud pro alio*).
- **Contraffazioni:** sono azioni fraudolente finalizzate a far apparire un alimento diverso da come è nella sua costituzione o a creare un prodotto ex novo apparentemente simile a quello reale. Questa pratica può essere ricondotta all'adulterazione o alla sofisticazione (Colavita, 2012).

4.2 Frodi nel comparto ittico

Il rischio di frodi nel comparto ittico è andato via via aumentando a causa della crescente richiesta di prodotti ittici e della globalizzazione dei mercati che hanno portato alla commercializzazione di specie ittiche provenienti da ogni parte del mondo, quindi non familiari ai consumatori e soprattutto alle autorità preposte al controllo. Anche in questo ambito possiamo parlare di frodi sanitarie, quando un prodotto potenzialmente tossico viene immesso sul mercato, e frodi commerciali, in cui una specie è illegalmente sostituita con un'altra dal valore inferiore (Civera, 2003; Martinez *et al.*, 2005).

Le principali frodi sanitarie delle specie ittiche riscontrate sono:

- Vendita o somministrazione di specie velenose spacciate per altre specie commercializzabili. Ad esempio, nel maggio del 2007 una coppia rimase intossicata dopo aver acquistato presso un negozio di alimentari asiatico a Chicago filetti di pesce palla spacciato per code di rospo (Cohen *et al.*, 2009);
- Vendita di specie che risultano essere tossiche solo in certe condizioni senza fornire al consumatore alcuna informazione in merito alle modalità di preparazione; tipico esempio è la commercializzazione di *Ruvettus pretiosus*, ricco di grassi non digeribili (simili a quelli di alcuni prodotti dimagranti), che possono causare disturbi gastrointestinali acuti,

spiacevoli e potenzialmente pericolosi, soprattutto nelle donne in gravidanza o in chi soffre di disturbi all'apparato digestivo. Per tale motivo secondo il Regolamento CE n. 2074/2005 recante modifica ai Reg CE n. 853/2004 e n. 854/2004, «*i prodotti della pesca freschi, preparati e trasformati appartenenti alla famiglia Gempylidae, in particolare Ruvettus pretiosus e Lepidocybium flavobrunneum, possono essere immessi sul mercato soltanto in forma di prodotti confezionati o imballati e devono essere opportunamente etichettati al fine di informare i consumatori sulle modalità di preparazione o cottura e sul rischio connesso alla presenza di sostanze con effetti gastrointestinali avversi. Sull'etichetta il nome scientifico deve figurare accanto a quello comune*» (<http://www.ilfattoalimentare.it/pesceburro-ruvetto-dissenteria.html>);

- Vendita di pesci freschi mescolati fraudolentemente con prodotti alterati o di minor pregio non dichiarati in etichetta;
- Importazione di prodotti ittici oggetto di specifici divieti sanitari (Reg.CE 853/04 e Reg.CE 854/04) propagandati come prodotti ittici di provenienze consentite;
- Occultamento di un cattivo stato di conservazione mediante l'attuazione di manovre fraudolente. Tipico esempio è il tonno trattato con monossido di carbonio che conferisce alle carni un colore rosso vivo (<http://www.nove.firenze.it/b102141855-tranci-di-tonno-al-monossido-carbonio-bloccati.htm>);
- Utilizzo di additivi consentiti oltre il limite stabilito e/o utilizzo di additivi non ammessi dalla normativa vigente al fine di ingannare il consumatore riguardo le caratteristiche organolettiche dei prodotti della pesca. Secondo il RASFF il 4,5% delle notifiche riguardano l'aggiunta di additivi per mascherare i processi di alterazione del pesce, per migliorare l'aspetto e aumentare in modo artificioso il peso (polifosfati, citrati, acqua ossigenata) (<http://www.ilfattoalimentare.it/additivi-pesce-imbrogliare-consumatore-non-dichiarati-etichetta-indagine-eurofishmarket.html>);
- Commercializzazione di prodotti raccolti in zone soggette ad ordinanze di divieto sanitario (o con tenori di biotossine superiori ai limiti) venduti come esemplari provenienti da acque autorizzate. (<http://www.statoquotidiano.it/05/03/2014/guardia-costiera-manfredonia-sequestro-1-tonn-molluschi-bivalvi/195558/>);
- Desquamazione per mascherarne la perdita in seguito a fenomeni di autolisi o putrefazione;
- Lavaggio con soluzioni a base di aceto, limone e sale per camuffare i cattivi odori che si formano dalla decomposizione;

- Toelettatura o asportazione di branchie, occhi e visceri per nascondere fenomeni alterativi e relative colorazioni anomale;
- Riprodurre la colorazione naturale di bocca e branchie con sangue di teleostei (soprattutto sgombro), animali da macello o coloranti;
- Contraffazione delle etichette in lingua italiana nei circuiti etnici quando esistono due diciture in lingua diversa allo scopo di commercializzare prodotti la cui importazione è vietata all'interno dell'Unione europea;
- Commercializzazione di pesce congelato scaduto o con TMC superato rietichettato con nuovo termine minimo di conservazione;
- Commercializzazione di molluschi bivalvi vivi prodotti da impianti abusivi venduti accompagnati da etichette false.

Le frodi ittiche commerciali che, con più facilità, si possono riscontrare sono:

- La frode per sostituzione di specie, conosciuta anche con il termine latino di “*aliud pro alio*”; consiste nella sostituzione di una specie pregiata con un'altra morfologicamente simile, ma di minor valore economico. Questa frode si applica soprattutto su prodotti della pesca preparati e trasformati, in cui è più difficile evidenziare eventuali manomissioni e quindi è maggiore lo sforzo da parte degli organismi di controllo. A tal proposito alcuni esempi di sostituzione riguardano: Pesce ghiaccio vs Bianchetto, Pesce palla vs Rana pescatrice, Passera vs Platessa, Pesce coltello vs Pesce sciabola, Potassolo vs Merluzzo o Nasello, Lanzardo vs Sgombro, Murena asiatica vs Anguilla. Ad esempio, un recente studio ha rivelato la sostituzione di “bocconcini di baccalà” con filetti di pesci appartenenti alla famiglia Lotidae e alle specie *Pollachius virens* (merluzzo nero) e *Brosme brosme* (Di Pinto *et al.*, 2007) oppure la commercializzazione di alimenti riportanti in etichetta specie nostrane come bianchetti e rossetti (novellame) ma sostituiti con le specie *Neosalanx* spp. e *Protosalanx* spp. data la somiglianza morfologica (Armani *et al.*, 2011);
- La vendita di un prodotto della pesca congelato spacciato per fresco. Lo scongelamento è consentito solo ed esclusivamente quando sull'etichetta viene riportata la dicitura “scongelato” (Reg 1169/11, Allegato VI, Parte A, Punto 2);
- Vendita di prodotti di allevamento per prodotti pescati;
- Falsa rigidità cadaverica ottenuta raffreddando i pesci in celle frigorifere qualche ora prima della vendita;

- Aumento di peso rispetto al peso originale, mediante introduzione di scaglie o pezzi di ghiaccio introdotti nelle fauci dei pesci, o nel mantello dei molluschi cefalopodi, o mediante il rinfresco dei molluschi bivalvi vivi allo scopo di mantenere il peso originario al momento dell'acquisto;
- Quantità dichiarata non corrispondente al peso netto, in prodotti ittici congelati glassati;
- Omissioni o false dichiarazioni in etichetta, soprattutto in merito all'area FAO di pesca ed al metodo di produzione.

Contemporaneamente alla globalizzazione e alla crescita del mercato dei prodotti ittici, si è assistito ad una maggiore diffusione del fenomeno del mislabeling; nasce quindi la necessità di attuare una normativa allo scopo di tutelare e informare in maniera corretta i consumatori circa i prodotti della pesca immessi sul mercato (Jacquet & Pauly, 2008).

CAPITOLO 5

Strumenti contro le frodi

5.1 Tracciabilità e rintracciabilità

La tracciabilità dei prodotti alimentari nasce come un'elemento fondamentale per garantire la sicurezza degli alimenti, considerando tutti gli aspetti della catena di produzione come un unico processo, partendo dalla produzione primaria, dalla produzione di mangimi fino alla vendita al consumatore. L'esperienza ha dimostrato che l'impossibilità di ricostruire il percorso compiuto da alimenti e mangimi può mettere in pericolo il funzionamento del mercato interno di tali prodotti. Attraverso il Reg. (CE) 178/2002 la Commissione europea ha voluto stabilire come necessario un sistema generale di tracciabilità per il settore, allo scopo di garantire la necessaria sicurezza per tutti gli animali, i prodotti e gli alimenti lungo tutte le fasi delle relative filiere, di ovviare ad eventuali emergenze e criticità e di fornire informazioni ai cittadini e agli operatori. Il Regolamento (CE) n. 178 del 2002 stabilisce infatti la cosiddetta "procedura di rintracciabilità", uno strumento che consenta ai consumatori di effettuare scelte consapevoli, definendola infatti 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"*.

La rintracciabilità così intesa è rivolta a consentire agli operatori e agli organismi di controllo, l'attivazione e la gestione di sistemi di allarme qualora sorgano eventuali problemi di sicurezza alimentare.

Per quanto riguarda i sistemi e le procedure messe in atto dalle aziende ai fini della rintracciabilità, gli organismi di controllo dovranno verificare che siano soddisfatti gli obiettivi posti dalle norme vigenti, senza entrare nello specifico di tali sistemi e procedure, in quanto la responsabilità primaria spetta all'operatore del settore alimentare (OSA).

Tutti gli agenti della filiera alimentare sono coinvolti nel sistema di tracciabilità, ovvero partendo dalla materia, passando attraverso trasformatori e distributori, fino al consumatore. L'azienda che commercializza il prodotto finale deve assicurare obbligatoriamente la

“creazione” di codici distintivi per ciascun lotto di produzione che viene immesso sul mercato, contenenti informazioni sulla data di produzione e sugli ingredienti utilizzati; inoltre, viene registrata l’assegnazione di ciascun lotto ai distributori finali (ad esempio i supermercati). A tal proposito particolare importanza riveste l’art. 19 del Reg. (CE) 178/2002 che specifica:

- obblighi del produttore in caso di prodotto non conforme ai requisiti di sicurezza stabiliti dall’art. 14, i produttori devono :
 - Identificare il prodotto;
 - Identificare l’ambito di commercializzazione;
 - Provvedere all’immediato ritiro;
 - Informare l’AUSL;
 - Informare l’anello a monte;
 - Attuare altre misure atte a tutelare la salute pubblica;
 - Informare il consumatore;
- obblighi degli operatori della vendita al dettaglio o della distribuzione che devono:
 - Ritirare dal mercato i prodotti di cui hanno ricevuto informazione di non conformità;
 - Ritirare dal mercato, informando il fornitore, i prodotti che loro stessi, o a seguito di segnalazioni dei consumatori hanno motivo di ritenere non conformi;
 - Collaborare con gli OSA a monte e con l’ AUSL ai fini della rintracciabilità;
 - Collaborare alle campagne di informazione e richiamo dei prodotti non conformi.

In questo modo, nel malaugurato caso in cui lotti di produzione dovessero essere ritirati dal mercato a causa di questioni legate alla sicurezza o alla qualità, il ritiro potrà essere quanto più tempestivo ed efficace possibile (http://www.guidaconsumatore.com/consumo_consumatori/etichetta-tracciabilita-e-rintracciabilita-dei-prodotti-alimentari.html).

Parlando di tracciabilità, è importante capire la distinzione tra i termini “tracciare” e “rintracciare”:

Tracciare (“*Tracking*”) è la capacità di descrivere il percorso di una materia prima o di un lotto di produzione attraverso i passaggi da un’entità commerciale ad un’altra, all’interno della filiera produttiva. In sostanza, al flusso di merci avviene parallelamente un flusso di informazioni, che vengono registrate e conservate ad ogni passaggio.

Rintracciare (“*Tracing*”) è la capacità di identificare la provenienza di una specifica unità localizzata all’interno della filiera. Al flusso fisico delle merci viene associato sistematicamente un flusso di informazioni conservate a monte della filiera.

La **tracciabilità** è il processo che segue il prodotto da monte a valle della filiera e fa in modo che, ad ogni stadio attraverso cui passa vengono lasciate opportune tracce (informazioni). Il compito principale è quello di stabilire quali elementi e quali informazioni devono essere tracciate.

La **rintracciabilità** è il processo inverso, che deve essere in grado di raccogliere le informazioni precedentemente rilasciate. Si tratta principalmente di evidenziare lo strumento tecnico più idoneo a rintracciare queste “tracce.” È la possibilità di rintracciare lungo tutto il processo produttivo tutte le componenti che hanno influito sul prodotto.

5.2 Etichettatura dei prodotti della pesca

Uno strumento fondamentale di supporto al processo di rintracciabilità è rappresentato dall’etichettatura. Infatti, in questo frangente l’etichettatura si pone l’obiettivo di comunicare al consumatore informazioni che caratterizzano il prodotto (<http://www.confcommerciopisa.it/limportanza-delletichettatura/>).

La legislazione nazionale e comunitaria è molto articolata; vede infatti una normativa **orizzontale** attuale costituita dal Regolamento (CE) 1169/2011 entrato in vigore il 13 dicembre 2011, ma che verrà applicato in modo graduale, tramite “tappe” intermedie (il periodo stimato per la completa applicazione è di tre/cinque anni) (http://www9.ulss.tv.it/Minisiti/prevenzione/sical/contenuti/00/content_files/file3/Etichettatura%20evoluzione.pdf), ed estende l’obbligo di etichettatura per i prodotti alimentari non preimballati e per quelli venduti nel circuito della ristorazione.

Nell’art. 9 ritroviamo l’elenco delle indicazioni obbligatorie:

- la denominazione dell’alimento;
- l’elenco degli ingredienti;
- qualsiasi ingrediente o coadiuvante tecnologico (elencato nell’allegato II o derivato da una sostanza o un prodotto elencato in detto allegato) che provochi allergie o intolleranze usato nella fabbricazione o nella preparazione di un alimento e ancora presente nel prodotto finito;
- la quantità di taluni ingredienti o categorie di ingredienti;
- la quantità netta dell’alimento;
- il termine minimo di conservazione o la data di scadenza;

- le condizioni particolari di conservazione e/o le condizioni d'impiego;
- il nome o la ragione sociale e l'indirizzo dell'operatore del settore alimentare responsabile dell'etichettatura;
- il paese d'origine o il luogo di provenienza ove previsto (Art. 26 – Paese d'origine o luogo di Provenienza);
- le istruzioni per l'uso, per i casi in cui la loro omissione renderebbe difficile un uso adeguato dell'alimento;
- per le bevande che contengono più di 1,2 % di alcol in volume, il titolo alcolometrico volumico effettivo;
- una dichiarazione nutrizionale.

La normativa **verticale** attuale consta invece di:

Regolamento (CE) 404/2011 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1224/2009 che istituisce un regime di controllo comunitario per garantire il rispetto delle norme della politica comune della pesca.

Regolamento (UE) 1379/2013 relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, si applica anche ai prodotti non preimballati, si applica a partire dal 1 gennaio 2014; nell'art.45 ritroviamo i requisiti relativi l'informazione dei consumatori:

- la denominazione commerciale della specie e il suo nome scientifico (contenuta nell'elenco predisposto dallo Stato membro e allegato al D.M. del 27/03/2002);
- il metodo di produzione; le diciture che possono essere utilizzate sono:
 - pescato in mare;
 - pescato in acque dolci;
 - allevato.
- la zona in cui il prodotto è stato catturato o allevato e la categoria di attrezzi da pesca usati nella cattura di pesci. Tale indicazione implica:
 - per i prodotti pescati in mare, l'indicazione di una delle zone di pesca definite dalla FAO.

| Zone di cattura | Definizione della zona |
|------------------------------|------------------------------------|
| Atlantico nord-occidentale | Zona FAO n. 21 |
| Atlantico nord-orientale | Zona FAO n.27 |
| Mar Baltico | Zona FAO n. 27. III.d |
| Atlantico centro-occidentale | Zona FAO n. 34 |
| Atlantico sud-occidentale | Zona FAO n. 41 |
| Atlantico sud-orientale | Zona FAO n. 47 |
| Mar Mediterraneo | Zona FAO n.37.1, 37.2, |
| Mar Nero | Zona FAO n. 37.4 |
| Oceano indiano | Zona FAO 51 e 57 |
| Oceano pacifico | Zona FAO n. 61, 67, 71, 77, 81, 87 |
| Atlantico | Zona FAO N. 48, 58, 88 |

Tabella 2. Zone di pesca FAO (Allegato alla circolare 27 maggio 2002, n. 1329; Reg. CE n. 2066/2001)

- per i prodotti pescati in acque dolci, l'indicazione dello Stato Membro o del Paese terzo di origine del prodotto;
 - per i prodotti allevati, l'indicazione dello Stato Membro o del Paese terzo di allevamento in cui si è svolta la fase finale di sviluppo del prodotto, ovvero la fase che intercorre tra lo stadio giovanile e la taglia commerciale. Quando l'allevamento è avvenuto in più Stati Membri o Paesi terzi, lo Stato Membro in cui si effettua la vendita al consumatore finale può, in base a quanto indicato dal **Regolamento (CE) n°2065/2001**, autorizzare al momento della vendita l'indicazione dei diversi Stati Membri o Paesi terzi di allevamento.
- se il prodotto è congelato;
 - il termine minimo di conservazione, se appropriato.

5.3 Tecniche molecolari basate sull'analisi del DNA per l'identificazione di specie nei prodotti ittici

Come detto precedentemente, nell'Unione europea, l'etichettatura prevede che i prodotti ittici devono essere etichettati riportando il nome commerciale e il nome scientifico, il metodo di produzione, la zona di cattura e la categoria degli attrezzi da pesca (Regolamento (CE) n 104/2000 e, a partire dal 13 Dicembre 2013 Regolamento (UE) n 1379/2013). Purtroppo, considerando le diffuse pratiche di *mislabeleding* (Jacquet & Pauly, 2008) si evince come la tracciabilità documentale non sempre è sufficiente a soddisfare tali fini. Uno dei criteri fondamentali dell'ispezione degli alimenti, ed in particolare dei prodotti ittici, utile a garantire il libero scambio delle merci e tutelare il consumatore, è l'identificazione di specie (Kyle & Wilson, 2007). Infatti, i metodi storici d'identificazione, denominazione e classificazione delle specie ittiche sono in gran parte basati su una valutazione morfologica. Tuttavia, rimangono molteplici difficoltà quando si tenta di identificare pesci durante le varie fasi del loro ciclo di sviluppo o quando si esaminano prodotti ittici trasformati. Anche quando i campioni sono rappresentati soggetti interi, le differenze morfologiche possono essere così sottili che l'identificazione risulta molto difficile, anche per i tassonomisti addestrati. Per ovviare a tali problemi, si preferisce utilizzare tecniche d'identificazione di specie mediante analisi molecolare (Ward *et al.*, 2009). Tradizionalmente le metodiche analitiche si sono basate sull'elettroforesi specie specifica, sulla cromatografia e sulle caratteristiche immunologiche delle proteine (Sotelo *et al.*, 1993; Civera *et al.*, 2003; Moretti *et al.*, 2003). Le tecniche più comunemente usate sono l'IEF (*Isoelectric Focusing*), la CE (*Capillary Electrophoresis*), l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ed i sistemi immunologici come l'ELISA (*Enzyme Linked Immuno Assorbent Assay*), che sono efficaci solo se il materiale di partenza non ha subito trattamenti o in presenza di un anticorpo specifico per la proteina target (Mackie *et al.*, 1999; Akasaki *et al.*, 2006; Carrera *et al.*, 1997; Asensio *et al.*, 2003, Barlett & Davidson, 1992).

Quindi, in relazione a queste limitazioni, attualmente si preferisce l'uso di tecniche basate sull'analisi DNA.

Il DNA rispetto alle proteine offre molteplici vantaggi; infatti, è più resistente e termostabile e, anche se presente in modestissime quantità, è possibile amplificarlo ad esempio aumentando il numero di cicli di PCR ottenendo in questo modo concentrazioni sufficienti per l'identificazione (Teletchea *et al.*, 2005). Inoltre, può essere estratto da qualsiasi tessuto (muscolo, spine, pinne, gonadi, ecc.) perché tutte le cellule dell'individuo contengono la

stessa informazione genetica, l'informazione contenuta nel DNA è maggiore di quella delle proteine.

Il recente uso di marcatori molecolari per l'identificazione di specie è incentrato sull'impiego di DNA mitocondriale. I mitocondri sono presenti in numero elevato all'interno delle cellule e quindi il DNA mitocondriale è presente in un numero di copie molto più elevato rispetto a quello nucleare (Ames *et al.*, 2004), evolve più velocemente del DNA nucleare e il suo alto tasso di mutazione relativa consente la differenziazione di specie strettamente correlate (Cespedes *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 2000), è più piccolo (da 160000 a 19000 nucleotidi) del DNA nucleare e ha una struttura circolare, con una resistenza maggiore al calore (Avise *et al.*, 1987; Borgo *et al.*, 1996). È quindi il bersaglio preferito quando si tratta di campioni di tessuto trattati o datati.

Tre sono i geni principalmente utilizzati:

- *Cytochrome c oxidase subunit 1 (COI)*: per ottenere l'amplificazione di questo gene esistono svariati primers universali con un ampio range tassonomico (Dawnay *et al.*, 2007), viene ampiamente utilizzato negli studi filogenetici essendo considerato il marker di scelta per la differenziazione di specie (Hebert *et al.*, 2003);
- *Cytochrome b*: presenta sia regioni con un alto livello di variabilità, utili per gli studi evolutivisti di specie strettamente correlate, sia regioni non variabili (Armani *et al.*, 2011a), possiede una minore variazione intraspecifica rispetto alla variazione interspecifica (Barlett & Davidson, 1992).
- *16S ribosomal RNA*: presenta un elevato livello di conservazione e rende possibile l'uso di primers universali o il disegno di nuovi primers per l'amplificazione di frammenti di DNA provenienti da un elevato numero di specie (Armani *et al.*, 2012) permettendo nella maggior parte dei casi (>90%), di raggiungere una identificazione di genere e non di specie (dal 65 al 83%) (Janda & Abbott, 2007).

5.3.1 Estrazione del DNA

Abbiamo a disposizione un ampio ventaglio di tecniche per l'estrazione del DNA, anche numerosi kit disponibili in commercio, che utilizzano soprattutto matrici silicee. In queste matrici il DNA viene adsorbito in presenza di alte concentrazioni di sali caotropici, in particolare idrocloruro e isotiocianato di guanidina. l'alterazione della forza ionica e del pH della soluzione e l'utilizzo di acqua distillata o un tampone a bassa concentrazione permettono la eluizione degli acidi nucleici. I fattori che determinano la scelta della tecnica per l'estrazione del DNA sono:

- le condizioni del campione;
- il tipo di tessuto;
- l'integrità del DNA;
- il tipo di applicazione prevista nel post estrazione.

L'obiettivo principale della tecnica di estrazione è quella di ottenere la maggiore quantità di DNA preservandone allo stesso tempo le caratteristiche qualitative. Per questo motivo la tecnica di estrazione deve rispettare due requisiti principali: la resa e la purezza, intesa 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

(<http://apollo11.isto.unibo.it/Tecnicidilaboratorio/Tecniche%20di%20biologia%20molecolare.pdf>).

Il percorso di estrazione e purificazione prevede quattro fasi:

- 1) Lisi delle cellule. Si tratta di una fase molto delicata, durante la quale bisogna evitare di danneggiare gli acidi nucleici da analizzare. Esistono metodi blandi come la lisi per osmosi, la digestione enzimatica (la più usata) o la solubilizzazione chimica; metodi moderati come l'omogeneizzazione a lame o la macinazione con mortaio; metodi vigorosi come il metodo "*French Press*", la sonicazione o la macinazione con microsferi (www.bioteconologie.univaq.it/getres.php?resid=529)
- 2) Inattivazione delle nucleasi. Quando l'acido nucleico è il DNA si utilizza la proteinasi K, ottenuta da un fungo saprofito (*Tritirachium album*) che digerisce le proteine associate all'acido nucleico e inattiva tutte le nucleasi cellulari.
- 3) Separazione e recupero dell'acido nucleico dalla soluzione contenente il lisato cellulare. I metodi classici prevedono l'utilizzo di solventi apolari come il fenolo e il cloroformio. Il fenolo denatura le proteine, formando legami idrogeno e alterandone la struttura. Il cloroformio completa la denaturazione delle proteine, rimuove i lipidi. Un metodo utilizzato è l'estrazione *salting out*, che utilizza sali ad alte concentrazioni per determinare una brusca diminuzione della solubilità delle proteine (*salting out*) 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 di degradare le proteine presenti che vengono allontanate mediante precipitazione con i sali (solfato di ammonio, solfato di sodio, acetato di sodio).

- 4) Precipitazione. Si usa alcol etilico o isopropanolo e permette di recuperare gli acidi nucleici in forma solida. Dopo lavaggio con etanolo, si ha una valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici estratti e infine lo stoccaggio.

5.3.2 Valutazione del DNA estratto

La valutazione quali-quantitativa del DNA estratto viene effettuata mediante un'analisi spettrofotometrica su un'aliquota di campione. Per stimare la quantità si valuta l'assorbanza a 260 nm del campione mentre per la valutazione qualitativa si prendono in considerazione i valori di assorbanza a 230 e 280 nm. Per ottenere un'indicazione sulla purezza del DNA è necessario mettere a rapporto il valore di assorbanza a 260 nm con i valori di assorbanza a 230 e 280: un DNA puro dovrebbe avere un rapporto compreso tra 1,8 e 2,0. La valutazione delle sostanze contaminanti deve essere presa in considerazione al momento della scelta delle procedure successive a cui sarà sottoposta la soluzione contenente gli acidi nucleici; infatti una contaminazione da proteine o da fenolo determina una sovrastima della concentrazione degli acidi nucleici e contemporaneamente un disturbo nell'attività degli enzimi che saranno impegnati per le successive analisi (Focà & Lamberti, 2003).

5.3.3 Degradazione del DNA

In condizioni normali, non appena un organismo muore, il suo DNA inizia a degradarsi. Il tasso di degradazione e la quantità di DNA che si degrada dipendono dal lasso di tempo che intercorre tra la morte e il momento dell'analisi e dalla tafonomia dell'organismo, intendendo con tale termine l'insieme delle condizioni ambientali e dei processi cui è sottoposto l'organismo dopo la morte (George, 1998). Il DNA possiede una limitata stabilità chimica e va incontro a decadimento senza i meccanismi enzimatici di riparazione delle cellule viventi (Lindahl & Nyberg, 1972). Quindi, dopo la morte delle cellule, le nucleasi cominciano a fendere il DNA in frammenti (Darzynkiewicz *et al.*, 1997) e, digerito da microrganismi (Lindahl, 1993; Eglinton *et al.*, 1991), la catena desossiribonucleotidica va incontro a decomposizione. Il decadimento a lungo termine del DNA avviene a causa di una reazione di idrolisi dei gruppi amminici che accelera la perdita di residui purinici (depurazione) (Lindahl & Andersson, 1972; Lindahl & Nyberg, 1972). In questo modo la frammentazione del DNA genera una caratteristica correlazione esponenziale negativa tra lunghezza dei frammenti di DNA e numero di molecole (Deagle *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2009; Adler *et*

al., 2011; Ottoni *et al.*, 2009). Tuttavia, non è noto se il tasso di frammentazione può essere considerato costante nel tempo, né in che misura varia tra campioni provenienti da ambienti deposizionali simili. Il tasso di depurinazione è influenzata da, pH e forza ionica e soprattutto temperatura (Lindahl & Nyberg, 1972), il che spiega perché la più estrema sopravvivenza del DNA è stata documentata in carote di ghiaccio di circa 450-800 mila anni (Willerslev *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda i prodotti ittici sottoposti a processi di trasformazione è stato visto che l'inscatolamento può determinare una degradazione del DNA tale da non permettere una corretta distinzione interspecifica, poiché l'aumento di temperatura determina la formazione di frammenti di DNA di lunghezza inferiore a 300 pb (Mackie *et al.*, 1999, Ebbehøj & Thomson, 1991; Chikuni *et al.*, 1991; Candrian, 1994). Questo fenomeno impedendo il recupero di sequenze sufficientemente lunghe, e quindi di informazioni genetiche, può impedire la corretta identificazione di specie come è stato osservato nello studio di Bartlett & Davidson (1991) in cui non è stato possibile discriminare 4 specie di tonno (*Thunnus thynnus*, *T. obesus*, *T. albacares*, *T. alalunga*) con il palamita (*Sarda sarda*) in prodotti sottoposti a trattamento termico. Elevati livelli di degradazione sono stati messi in evidenza anche in campioni sottoposti a differenti modalità di cottura (Armani *et al.*, 2015).

5.3.4 Amplificazione del DNA: *Polymerase Chain Reaction*.

La PCR è una tecnica che consente di ottenere rapidamente milioni di molecole identiche di DNA a partire da quantità estremamente ridotte dell'acido nucleico. Infatti la PCR è una reazione di amplificazione in vitro di uno specifico frammento di DNA per mezzo di una DNA polimerasi. Un prerequisito indispensabile al realizzarsi della reazione è la conoscenza delle sequenze alle estremità della regione bersaglio. Infatti, nella reazione sono coinvolti due oligonucleotidi a singolo filamento (primer) complementari uno all'estremità 3' e l'altro all'estremità 5' del segmento di DNA che si vuole amplificare, che costituiscono gli elementi di innesco dell'attività della DNA polimerasi. Altri elementi coinvolti nella reazione sono i desossiribonucleotidi e il MgCl₂: i primi sono necessari per la sintesi delle nuove eliche ed il secondo rappresenta il cofattore indispensabile alla DNA polimerasi. La reazione viene suddivisa in tre step, ognuno realizzato a temperatura diversa, e viene ripetuta ciclicamente per un numero di volte definito a seconda delle esigenze. Per far sì che la reazione avvenga rapidamente e in modo corretto, la provetta viene inserita all'interno di un apparecchio, il termociclatore, in grado di cambiare la temperatura al suo interno in modo estremamente rapido e per un numero di volte pari al numero di cicli desiderati.

Una reazione di PCR contiene necessariamente diversi componenti quali:

- 1) Una DNA polimerasi termostabile (Taq DNA Polimerasi) per catalizzare la sintesi di DNA dipendente da un frammento stampo;
- 2) Una coppia di oligonucleotidi sintetici (primers) per iniziare la sintesi di DNA;
- 3) Desossinucleotidi trifosfati (dNTP) utilizzati per sintetizzare il nuovo filamento di DNA;
- 4) Cationi bivalenti: $MgCl_2$ (cofattore della DNA Polimerasi)
- 5) Soluzione tampone (buffer) per mantenere la DNA polimerasi in condizioni ottimali (pH 8-9 a seconda del tipo di Taq)
- 6) DNA stampo che contiene la regione da amplificare

La reazione prevede il succedersi di cicli di amplificazione durante i quali si alternano tre diverse temperature che rendono possibile rispettivamente:

- **Denaturazione.** Il DNA deve essere portato ad una condizione di singola elica (*single-stranded*) in modo che successivamente si verifichi l'appaiamento (*annealing*) alle molecole di primer (anch'esse a singolo filamento). Per fare ciò la soluzione contenente il DNA viene portata ad una temperatura al di sopra della sua "temperatura di fusione (T_m)" (*melting temperature*), nella quale i legami ad idrogeno, non più stabili, permettono la separazione tra i due singoli filamenti del DNA. Nel tampone di reazione in cui viene normalmente effettuata la reazione di PCR la temperatura di fusione è solitamente compresa tra 92 e 96 °C e la denaturazione viene favorita dalla presenza di concentrazioni saline relativamente alte (circa 150mM NaCl). La *Taq* DNA polimerasi ha solitamente una emivita di 30 min a 95 °C. Questo fatto limita il numero di cicli della PCR ed il tempo di denaturazione del primo step. Infatti considerando una incubazione di 1 min a 95 °C per ogni ciclo di PCR il numero di cicli effettuabili non può essere superiore a 30-35. Diminuendo il tempo di denaturazione a 15-30 sec i cicli di PCR possono solitamente essere aumentati fino a 45. È inoltre possibile ridurre la temperatura di denaturazione dopo i primi 10 cicli di PCR. Ad esempio per ampliconi di lunghezza inferiore a 3 Kbp si può effettuare la denaturazione a 88 °C (per frammenti di DNA amplificati con meno del 50% di contenuto in G+C).
- **Annealing** (appaiamento dei primers). Nel mettere a punto le reazioni di PCR si possono seguire essenzialmente due tipi di criteri riguardo alla T_a :
 - 1) T_a costante durante i cicli;
 - 2) T_a che diminuisce ciclo dopo ciclo (*touch-down*)

Nella gran parte delle reazioni la T_a rimane costante per tutta la durata della reazione e non si effettuano variazioni lungo i cicli. La strategia di reazione *touch-down* permette di

rendere i primi cicli di PCR estremamente “stringenti”, cioè tali da promuovere l’amplificazione solo di frammenti specifici rendendo instabili eventuali annealing dei primer a sequenze di DNA non perfettamente complementari. In effetti una T_a troppo bassa porta all’*annealing* dei primer a sequenze non esattamente complementari e quindi all’amplificazione di frammenti non specifici, mentre una T_a troppo alta può ridurre la resa in quanto solo una frazione delle molecole del primer riesce ad innescare la polimerizzazione a causa dell’elevata instabilità del loro appaiamento con il DNA stampo. Il tempo di *annealing* infine non deve essere troppo lungo (in modo da sfavorire appaiamenti a stampi con bassa complementarietà). Di solito si utilizzano tempi dell’ordine di 30 secondi o meno.

La temperatura di *annealing* è un parametro variabile capace di determinare la specificità di un esperimento di PCR. La scelta di tale temperatura è legata alla temperatura di fusione (T_m) del DNA da amplificare. La T_m è la temperatura alla quale il 50% del DNA è presente come singolo filamento. La temperatura di *annealing* viene di solito fissata ad un valore inferiore di 3-5 °C rispetto alla T_m degli oligonucleotidi scelti come primer. La Taq polimerasi non viene denaturata alle alte temperature e quindi può essere usata negli esperimenti di PCR non essendo degradata durante i cicli di reazione. La possibilità di utilizzare cicli di reazione a temperature elevate aumenta la specificità della PCR diminuendo le interazioni aspecifiche tra i primer e i filamenti di DNA. Un appaiamento erroneo dei primer (*mismatch*) può produrre un’efficiente amplificazione di sequenze aspecifiche indesiderate. I primer possono appaiarsi con sequenze che differiscono leggermente dalle sequenze bersaglio, la DNA polimerasi impiegherà questi primer appaiati erroneamente per sintetizzare un filamento complementare a una sequenza indesiderata in direzione 3’ rispetto al primer. Il primo appaiamento erroneo produrrà un filamento di DNA di lunghezza indefinita che conterrà il primo primer incorporato nell’estremità 5’. Un appaiamento erroneo del secondo primer su questo filamento indesiderato produrrà una molecola di DNA a doppia elica: in questa un filamento avrà nella sua estremità 5’ il secondo primer e nell’estremità 3’ la sequenza complementare al primo primer. Il secondo filamento così generato rappresenta adesso uno stampo perfetto per i successivi cicli di amplificazione, e la concentrazione del DNA indesiderato aumenta proprio come quella della sequenza bersaglio. Il frammento non corretto sintetizzato nei primi cicli della PCR può essere amplificato in modo efficiente nei cicli successivi e così via.

- *Elongation* (estensione dei primers).

La temperatura utilizzata è solitamente compresa tra 68 e 72 °C. La *Taq* DNA polimerasi ha un'attività specifica a 37 °C. Tuttavia l'attività della *Taq* DNA polimerasi ha il suo massimo a circa 70 °C e l'estensione dei primer avviene ad una velocità di circa 100 basi/sec. Generalmente 1 min è sufficiente per amplificare con una buona resa stampi lunghi circa 1 Kbp. Il tempo di estensione viene quindi calibrato sulla lunghezza dello stampo da amplificare tenendo conto che una preparazione di *Taq* DNA polimerasi, a causa della sua processività non alta, solitamente non amplifica con buona resa frammenti di DNA di lunghezza superiore a 3 Kbp. Il numero di cicli di amplificazione necessari ad ottenere una banda visibile su gel di agarosio dipende in gran parte dalla concentrazione di DNA iniziale. Tuttavia l'effetto del numero dei cicli non è proporzionale a causa della presenza del cosiddetto "effetto plateau" in cui nelle fasi tardive dell'amplificazione il tasso di accumulo di prodotto diminuisce a causa di numerosi fattori tra cui la degradazione dei reagenti (dNTPs, DNA polimerasi), inibizione da parte del pirofosfato accumulato (inibizione da prodotto). In generale il numero di cicli è compreso tra 30 e 45.

5.3.5 Metodiche di sequenziamento del DNA

Un tempo si otteneva una sequenza di DNA separando le molecole su gel di poliacrilamide ma ormai questa tecnica è poco diffusa e comunque limitata ad applicazioni particolari. Da vari anni, infatti, i frammenti di DNA sono separati su sequenziatori automatici a 96 capillari che possono processare fino a 384 campioni in 16 ore. La chimica adottata è quella di Fred Sanger (http://www.bio.unipd.it/molbinfo/Corso_Bioinfo_2/lessons/genomica-info.pdf). Si tratta di una metodica relativamente semplice che consiste nel far sintetizzare frammenti di catena polinucleotidica di lunghezza diversa sullo stampo del DNA che si vuole sequenziare. Per ottenere la sintesi della nuova catena si utilizzano oltre ai 4 dNTP anche uno dei 4 ddNTP (base azotata che presenta un H all'estremità 3'). In presenza di DNA polimerasi un ddNTP può essere incorporato all'estremità 3' di una catena nucleotidica in accrescimento su un filamento di DNA stampo, interrompendo l'attività della polimerasi poichè non è disponibile l'OH in 3' e rilasciando un frammento "monco".

La miscela contenente il DNA da sequenziare viene suddivisa in 4 frazioni (A, T, G, C), a ciascuna delle quali si aggiunge un diverso ddNTP, cioè ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP e si incuba per un tempo prestabilito. L'incorporazione del ddNTP nella catena in accrescimento è del tutto casuale e durante l'incubazione si formano in ciascuna frazione frammenti polinucleotidici di lunghezza diversa aventi:

- sequenza iniziale uguale a quella del primer;
- sequenza successiva in direzione 5' 3' complementare al segmento duplicato del DNA stampo;
- i terminanti con il ddNTP presente in quella frazione.

Dopo incubazione le quattro frazioni vengono denaturate al calore, per separare le catene nucleotidiche appaiate e sottoposte ad elettroforesi in un unico gel di poliacrilammide. In questo modo è possibile evidenziare centinaia di bande e separare catene che differiscono di un solo nucleotide. Nelle 4 corsie del gel le bande si disporranno in ordine di lunghezza dal fondo verso la zona di deposizione e disponendole in successione si potrà risalire alla sequenza del frammento di DNA usato come stampo.

Il risultato di un sequenziamento è visualizzato sotto forma di cromatogramma, che visualizza le emissioni in fluorescenza che identificano ciascuna delle 4 basi del DNA. Ciò risulta in una serie di picchi di fluorescenza (a frequenze diverse) letti da un "*base caller*", un programma che legge il cromatogramma ed interpreta i picchi, assegnando a ciascuna posizione una lettera ed un corrispondente valore numerico (*quality value*) che è relativo alla quantità di rumore di fondo. Il risultato è un file FASTA associato ad un file di quality:

```
>yneN
TTAATGCCTCTTCTCATTCTTCTGCTGTCATCCGCACAGCAGAAGAATTCCTCATTGAC
TATTATTTTCGCAATTTGCTCACATGGATTAATACTAACTACATACTATAAGATATAAACT
TCTGCCTACAGCTGTAAGAACTCCGCTCAGTACTGAAGCACCAGTCTTATTTCTCTTT
TCTCCAGCCTGTATATTAAGCATACTGATTAACGATTTTTAACGTTATCCGCTAAATAA
ACATATTTGAAATGCATGCGACCACAGTGAAAAACAAAATCACGCAAAGAGACAATA
A
>yegR
ACTAACGGCTGCCACCGATAAATTTCAAAAAAGAGCATATACCTAATATTCAACTAAACA
GTGGCATCTTCAATATAATATATTAAGCCCCATGGAGTTACCTGAAGGGCCTCAATG
TCCGTAATTCCTACTTATGTAGGAAATGTTGTACAGAACATTTATATAATCCTATTCAA
TTATAATAATCATGCCATTATTATATTTAAACACTAGAGAGTGTGTTGGTATTTAATGG
GGGAAGGTGAGATGAAAAAGATAGCTGCTATATCATTAAATAGTATTTTATTATGCTG
G
>emrK
AAATCAGGGATTGTACCGATGATTTATAGTTTCAAGTTGGCACTATAAGTCTTCTTACTA
ATCCTACAGGCGTAAGAATTGTATTGCAAAAGCCACGGTTTAGTCCCTGTTGTTTTTTT
TGCACCTCATTTAAATTAGGCCTCCAACGTTCTGGGATAATGTGCAACACATGCACTGT
GTTTGATATGAAGAATGAATGCTCTTTTCATTCAATTCATAAATTTTCATCTATGAGAAAT
GAGAGATAATAGTGAAACAGATTAATTCAAAATAAAAAACATTCTAACAGAAGAAAAATA
T
>evgA
AATACAATTCCTACGCCTGTAGGATTAGTAAGAAGACTTATAGTGCCAACTTGAAACTAT
AAATCATCGGTACAATCCCTGATTTTATTGTTGACATTTTATTATGCCGACTATTTATA
TGGTATACTTGTCGAATTATCTTAAAGGAAGCTCAGATTTTCTTATTTTATTGAGAAAA
TGAGATGACGCCTTATGTCTGTATTACTACAGGGAGAAGGGAGATGCTTCATTGCAAAGG
GAATAATCTATGAACGCAATAATTATTGATGACCATCTCTTGCTATCGCAGCAATTCGT
>yfdX
TGGCTGTATTACATTTAATTAATCAGTATTTACATCGATATAATAAATGACATCTCTTT
GTGGTATATAAGAATAGTTCTCTGCGACAGGAAGCATATTTCTACAATTGTAAGACTAAA
ATACCTCTTGCGATAAATACTACAAGTAAAGATAACCCCTTTCAAATGACCGTTGCTCT
CTGATTTCTCATTTCATGCTCACCCAATATGATGGCGGCTTTTCTAAAAGTGTAAAGA
ATGAGGTAAGTATGAAACGTTAATTATGGCCACGATGGTCACAGCAATTCCTGGCATCTT
C
```

Immagine 1: file FASTA (<http://bioinformatics.intec.ugent.be/MotifSuite/fastafomat.php>)

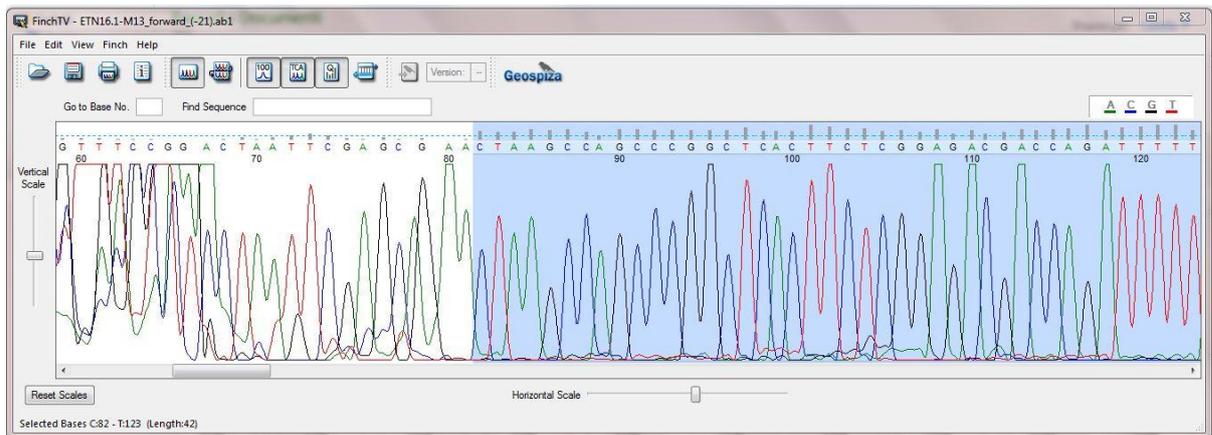


Immagine 2: file di quality. All'estremità 5' del cromatogramma si trovano quasi sicuramente sequenze di bassa qualità; all'inizio della reazione di sequenziamento, i frammenti di DNA finiscono con il terminatore fluorescente, come ci si aspetta, ma sono molto corti.

5.3.6 DNA *barcoding*

Il DNA *barcoding* è una metodica molecolare, nata da un'iniziativa di Paul D.N. Hebert dell'Università di Guelph (Ontario, Canada), che sfruttando la variabilità di un marcatore molecolare permette l'identificazione di identità biologiche. Nel suo articolo, "*Biological identifications through DNA barcodes*" del 2003, Hebert propone un nuovo sistema di identificazione e individuazione delle specie utilizzando un breve tratto di DNA da una regione del genoma standardizzata. Tale sequenza di DNA può essere utilizzata per identificare specie diverse, nello stesso modo in cui un lettore del supermercato utilizza il codice a barre UPC (*Universal Product Code*) per identificare gli acquisti (<http://www.ibol.org/about-us/what-is-dna-barcoding/>). Il DNA *barcoding* può avere una duplice finalità, è un valido strumento per i tassonomisti, per aumentare le loro conoscenze, ma anche per i meno esperti che necessitano di effettuare un'accurata identificazione (Hebert *et al.*, 2003). La tecnica è basata sull'analisi della prima parte della sequenza genica del citocromo c-ossidasi I (*COI*) della lunghezza di ~655 pb (*full DNA barcoding*) e rappresenta l'approccio più comune nel caso di prodotti non trasformati. Invece, il mini DNA barcoding (139 pb) è stato usato in alternativa e con successo per l'identificazione delle specie in caso di prodotti trasformati. Infatti, l'amplificazione di una regione più breve potrebbe rappresentare l'unica possibilità di ottenere informazioni molecolari da prodotti contenenti DNA degradato (Armani *et al.*, 2015a).

Questa regione del DNA mostra di solito una variazione interspecifica superiore rispetto a quella intraspecifica, permettendo la discriminazione efficiente tra le specie (Hebert, Ratnasingham & de Waard, 2003). Il gene *COI* si è dimostrato un gene universale e affidabile per l'identificazione di varie specie di pesci sia marini (Ward *et al.*, 2005) che d'acqua dolce (Steinke *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2005), come i pesci piatti (Terol *et al.*, 2002; Espineira *et al.*, 2008), tonni (Terol *et al.*, 2002; Lowenstein *et al.*, 2010), acciughe (Jerome *et al.*, 2008), squali (Barbuto *et al.*, 2008), pesci gatto (Carvalho *et al.*, 2011), sardine (Grant & Bowen, 1998). Un ideale DNA *barcode* per funzionare correttamente prevede due fondamentali caratteristiche: l'universalità (ovvero un'ampia copertura tassonomica) e un'alta risoluzione (Ficetola *et al.*, 2010). L'universalità permetterebbe di applicare il gene scelto come DNA *barcode* ad un range tassonomico che sia il più ampio possibile (incluse specie non descritte o rare). La risoluzione si riferisce invece all'abilità di un dato *barcode* di differenziare le specie basandosi sulla quantità di differenze interspecifiche tra le sequenze di DNA. Altra caratteristica che il marker molecolare scelto come barcode dovrebbe mostrare è una variabilità interspecifica più alta di quella intraspecifica. Di conseguenza, un'ideale analisi di DNA *barcoding* presuppone che le distribuzioni della variabilità inter e intraspecifica siano separate una distanza detta "DNA *Barcoding gap*", ovvero la differenza tra le distanze genetiche inter- e intraspecifiche all'interno di un gruppo di organismi (Meyer & Paulay, 2005; Wiemers & Fiedler, 2007). Il DNA *barcode* assicura una "robusta" identificazione dell'individuo di cui si conosce bene la tassonomia e se gli individui rappresentativi sono ampiamente campionati (DeSalle *et al.*, 2005), mentre è difficoltoso identificare esemplari ignoti che appartengono a taxa non ben descritti (Rubinoff *et al.*, 2006). E' quindi necessario un estensivo campionamento con esemplari appartenenti a popolazioni allopatriche per ciascuna specie in esame, per quantizzare la variabilità intraspecifica (Frézal & Leblois, 2008). Il DNA *barcoding* ha infatti valore solo se accompagnato da una corretta tassonomia tradizionale (Hebert *et al.* 2004).

Il DNA *barcoding* necessita di alcuni elementi essenziali:

- I campioni: provenienti da musei di storia naturale, erbari, zoo, acquari, raccolte di tessuti congelati, e altre raccolte di materiale biologico, rappresentano la principale fonte di campioni identificati;
- Le analisi di laboratorio: indispensabili per ricavare le sequenze di DNA dai suddetti campioni;

- Il database: rappresenta la biblioteca di consultazione pubblica che contiene le sequenze ottenute da esemplari di riferimento che possono essere usate per identificare le specie ignote. Attualmente questa funzione è svolta dal *Barcode of Life Database* (BOLD).
- L'analisi dei dati: l'identificazione dei campioni avviene sulla base del livello di corrispondenza con la sequenza di riferimento nel database.

Grazie alla sequenza nucleotidica è possibile ricavare informazioni dai campioni analizzati. Ciò è possibile grazie ad adeguati sistemi di confronto che permettono l'allineamento delle sequenze ottenute con sequenze di riferimento presenti sui database come GENBANK (BLAST) o BOLD (*Barcode of Life Database*) o altre banche dati simili in modo da ricavare valori di identità che consentono di identificare la specie. La tecnica del DNA *barcoding* necessita di un database ricco di informazioni ma sfortunatamente questo accade solo per alcune specie. Inoltre, è necessaria una corretta identificazione morfologica dei campioni per produrre una sequenza di riferimento, accompagnata da una documentazione fotografica in caso di campioni che non possono essere analizzati interamente. Infine tutti i campioni utilizzati per la realizzazione del database, dovrebbero essere chiaramente conservati per ulteriori analisi.

BOLD, è una piattaforma web che offre un ambiente integrato per il montaggio e l'uso dei dati del DNA *barcoding*. Fornisce un database online per la raccolta e la gestione dei campioni, nonché strumenti analitici per sostenere la loro validazione. Nel corso degli ultimi anni, BOLD è cresciuto fino a diventare un potente banco di lavoro on-line e il fulcro informatico centrale della comunità che utilizza la tecnica del DNA *barcoding* (http://eol.org/content_partners/130).

Le sequenze geniche depositate nel database, devono rispettare 3 requisiti:

- devono derivare da una specifica regione del gene;
- devono rispettare gli standard qualitativi;
- ci deve essere un collegamento tra la sequenza e il campione d'origine (Ivanova *et al.*, 2007).

BOLD possiede una duplice funzione riguardo l'identificazione dei campioni. Una, testa la validità di identificazioni già esistenti e l'altra funzione assegna un'identificazione ai campioni che non hanno una collocazione tassonomica. Il sistema di identificazione su BOLD consente l'identificazione se la sequenza mostra una stretta corrispondenza, con una divergenza inferiore all'1%, con la sequenza di riferimento. Alcune volte può accadere che 2 o più taxa hanno in comune delle sequenze con una divergenza inferiore all' 1%, allora in questi casi sono mostrate tutte le possibili specie.

Se il sistema trova una corrispondenza a livello di specie, l'utente può accedere alla pagina della specie e avere a disposizione tutte le informazioni disponibili presenti in BOLD o anche in altri siti correlati. Quando, invece, non viene trovata una corrispondenza a livello di specie, BOLD assegna quella sequenza a un genere che mostra una divergenza rispetto a una sequenza di riferimento di quel genere inferiore al 3%.

A differenza dei database classici il BOLD richiede un maggior numero di condizioni per il deposito delle sequenze; quest'ultime, infatti, devono riportare due tipologie di informazioni per essere inserite nel sistema:

1. Informazioni relative al campione:

- Il nome della specie;
- Il voucher number, cioè il codice identificativo assegnato dall'istituto che detiene il tessuto o l'organismo di riferimento;
- I dati relativi alla raccolta (data, località e nominativo del raccoglitore);
- Colui che ha identificato morfologicamente l'esemplare.

2. Informazioni relative alla sequenza:

- Sequenze non inferiori a 500pb;
- Primers utilizzati per l'amplificazione;
- Trace files delle sequenze.

Tutti i dati forniti vengono poi forniti agli utenti del sistema in due pagine principali (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Un altro strumento che permette di analizzare le sequenze è il BLAST (*the Basic Local Alignment Search Tool*) che è stato progettato specificatamente per ricercare sequenze nucleotidiche e proteiche all'interno di database per livelli di identità, partendo da partite perfettamente corrispondenti fino a sequenze con somiglianza molto bassa (http://www.garlandscience.com/res/pdf/practicalbioinformatics_ch3.pdf). È stato criticato da Forster (2003) e Nillson *et al.* (2006) per il fatto che alcune sequenze non corrispondono alla specie dichiarata molto probabilmente a causa di una contaminazione o ad un'errata identificazione dell'esemplare, per la mancanza di alcune informazioni e per la terminologia incoerente.

CAPITOLO 6

Scopo della tesi

Il crescente consumo di prodotti ittici a livello mondiale ha determinato la commercializzazione di nuove specie ittiche provenienti soprattutto dal continente asiatico. Pertanto si è assistito alla diffusione sui mercati internazionali di nuove tipologie di prodotti a base di pesce. Inoltre, l'aumentata complessità della filiera ittica, dovuta all'elevato numero di operatori del settore ha reso sempre più difficile la verifica della tracciabilità dei prodotti predisponendo il settore al fenomeno delle frodi. In particolare, nelle rivendite alimentari all'interno delle comunità etniche presenti sul territorio nazionale è possibile trovare una vasta gamma di prodotti ittici variamente processati che spesso presentano non conformità per quanto riguarda l'etichettatura. Infatti, la sostituzione di specie risultata facilitata per quei prodotti in cui non è più possibile verificare l'identità attraverso un'analisi morfologica, come i prodotti *“ready to eat”* e *“ready to cook”*. In questo lavoro, al fine di verificarne la tracciabilità, 68 prodotti ittici, freschi e trasformati, acquistati presso punti vendita gestiti da cittadini cinesi e bengalesi sono stati analizzati utilizzando la tecnica del full DNA *barcoding* e del mini DNA *barcoding* che prevedono, a mezzo di primers universali, l'amplificazione di un frammento di ~ 650 pb e di ~ 139 pb, rispettivamente. Successivamente, tutte le informazioni riportate in etichetta sono state analizzate alla luce di quanto previsto dalla normativa comunitaria di settore e confrontate con i risultati dell'analisi molecolari al fine di evidenziare eventuali non conformità.

CAPITOLO 7

Materiali e metodi

7.1 Raccolta dei campioni

Sessantotto prodotti ittici (pesci, molluschi e crostacei), interi o preparati in varie forme (a filetti, a pezzi, impanati), non trasformati (semplice congelamento) o trasformati (essiccati, salati, inscatolati, arrostiti e affumicati), variamente confezionati (in buste di plastica, inscatolati, sotto vuoto), sono stati acquistati in mercati alimentari al dettaglio nella comunità cinese di Prato e nelle rivendite alimentari condotte da cittadini bengalesi a Pisa durante il 2014 (Tabella 3; Tabella 4). Sulla base della definizione fornita dal Reg.(CE) 852/2004 riguardo i "prodotti non trasformati": *prodotti alimentari non sottoposti a trattamento, compresi prodotti che siano stati divisi, separati, sezionati, affettati, disossati, tritati, scuoiati, frantumati, tagliati, puliti, rifilati, decorticati, macinati, refrigerati, congelati, surgelati o scongelati*, i campioni sono stati suddivisi in due gruppi (non trasformati o trasformati).

Ogni prodotto è stato portato al nostro laboratorio dove è stato effettuato un controllo visivo per mezzo di una semplice analisi morfologica. Ogni prodotto è stato registrato con un codice interno, fotografato e stoccato (a temperatura ambiente o a -20 C°, a seconda il tipo di lavorazione) fino ad ulteriore analisi.

7.2 Analisi molecolari

7.2.1 Prelievo del tessuto, estrazione del DNA, valutazione del frammento di DNA con elettroforesi su gel di agar

Nel caso di prodotti costituiti da una sola specie sono stati prelevati come minimo 3 campioni. Nel caso di una singola confezione, composta da otto specie differenti (ETN 54), la raccolta è stata eseguita almeno su un campione di ogni specie. L'estrazione del DNA è stata seguita a

partire da 100 mg di tessuto, come descritto da Armani *et al.*, (2014). I tessuti prelevati dai prodotti salati ed essiccati sono stati lavati e reidratati con acqua corrente per tutta la notte. La qualità e la quantità del DNA è stata determinata con uno spettrofotometro.

Mille nanogrammi di DNA totale estratto dai tessuti sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel all'1% di agarosio GellyPhorLE (Euroclone, Wetherby, UK), colorato con GelRed™ Nucleid Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, USA) e visualizzato attraverso illuminazione ultravioletta. La lunghezza degli ampliconi ottenuti è stata stimata tramite confronto con il marcatore standard Sharp Mass™50-DNA e Sharp Mass™1-DNA.

7.2.2 Full DNA Barcoding: amplificazione e sequenziamento

Un frammento di 655-658 bp del gene *COI* è stato inizialmente amplificato dal DNA estratto da tutti i campioni, utilizzando due coppie di primer universali (PP₁ e PP₂) per la regione *COI* (Tabella 5). Il protocollo di PCR, effettuato in un volume finale di 20 µl, è stato il seguente:

2µl a 10x di buffer (5Prime, Gaithersburg, USA), 100µM di ogni dNTP (Euroclone, Pavia, Italy), 250nM di primer forward, 250nM di primer reverse, 2,5 ng/µl di BSA (New England BIOLABS® Inc. Ipswich, MA, USA), 2,5 di U PerfectTaq DNA Polimerasi (5Prime, USA), 100 ng di DNA e DNase acqua sterile (5Prime, USA) con il seguente programma di cicli: denaturazione a 94 °C per 3 minuti, 45 cicli a 94 gradi per 30 secondi, 47-53°C (dipendente dalla coppia di primer vedi Tabella 5) per 30 secondi, 72°C per 35 secondi; extention finale a 72°C per 10 minuti.

5µl dei prodotti della PCR sono stati visualizzati attraverso corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,8% e la presenza dell'amplificato richiesto è stato valutato attraverso un confronto con il marker standard SharpMass™50-DNA ladder. L'amplificato è stato purificato e sequenziato presso l'*High-Throughput Genomics Center* (Washington, USA).

7.2.3 Mini DNA Barcoding: amplificazione e sequenziamento

I campioni di DNA che non hanno restituito l'amplicone atteso utilizzando il protocollo per l'amplificazione del FDB sono stati amplificati utilizzando la coppia di primer FISHCOILBC_ts/REVshort1 (Tabella 5) per l'ottenimento di un MDB (~190 pb MDB, 139 pb senza primers). La PCR è stata eseguita secondo Armani *et al.*, (2014). Tutti i prodotti della PCR sono stati purificati e sequenziati come resoconto nella sezione 7.2.2

7.2.4 Analisi delle sequenze e confronto con i database

Le sequenze ottenute sono state analizzate usando il programma Clustal W in Bio Edit version 7.0.9. (Hall, 1999). Eventuali correzioni sono state effettuate manualmente dopo un'ispezione visiva.

Tutte le sequenze sono state usate per eseguire un'analisi BLAST su GenBank e analizzate usando il sistema di identificazione (ID) su BOLD (*Species Level Barcode Records*) per stimare la conformità tra le informazioni riportate in etichetta e quelle ottenute dall'analisi molecolare. Un valore di identità del 98% è stato utilizzato come valore soglia per designare l'avvenuta identificazione di specie (Barbuto *et al.*, 2010).

Dato che le sequenze *COI* ottenute in questo studio non derivavano da campioni di riferimento o da campioni di pesce identificati, non sono state depositate né su GenBank né su BOLD.

7.3 Analisi delle informazioni riportate in etichetta

L'analisi delle etichette è stata eseguita come descritto in D'Amico *et al.* (2014) . In particolare, le informazioni riportate in etichetta sono state valutate alla luce dei requisiti del Regolamento del Consiglio (CE) n. 104/2000 (norma in vigore durante l'esecuzione delle analisi).

CAPITOLO 8

Risultati e discussioni

8.1 Raccolta dei campioni

Sebbene, secondo le informazioni riportate in etichetta, i prodotti raccolti fossero 54 pesci, 13 molluschi (dei quali 10 cefalopodi, 2 bivalvi e 1 gasteropode) e 1 crostaceo, l'ispezione visiva, successivamente confermata dall'analisi molecolare, ha evidenziato alcune incongruenze. Infatti, sulla base delle indagini molecolari i campioni sono stati identificati come: 57 pesci, 10 molluschi (dei quali 7 cefalopodi, 2 bivalvi e 1 gastropode) e un crostaceo (Tabella 4).

Dei 68 prodotti raccolti, 31 erano interi e 37 preparati in vari modi (decapitati, eviscerati, filettati); 19 (28%) erano solamente congelati (non trasformati), mentre i rimanenti 49 (72%) erano trasformati: in particolare, 22 erano solo essiccati e 6 solo inscatolati, mentre tutti gli altri avevano subito più di un tipo di lavorazione (congelati e essiccati, congelati e salati, congelati, essiccati e salati, essiccati e arrostiti, essiccati e affumicati) (Tabella 3). È interessante notare che tutti gli 11 prodotti del Bangladesh non erano processati, mentre 41 (72%) dei 57 prodotti cinesi erano stati prodotti usando più di un metodo (Tabella 3). Inoltre, 24 prodotti cinesi (42,1%) erano “*ready to eat*”. A differenza di questo lavoro, i più recenti studi che hanno utilizzato la tecnica di DNA *barcoding* per l'identificazione di prodotti ittici hanno campionato e analizzato principalmente prodotti non processati (Tabella 6).

8.2 Analisi molecolari

8.2.1 Estrazione del DNA e valutazione della frammentazione del DNA mediante elettroforesi su gel

Tutti i campioni di DNA estratti hanno mostrato buoni valori quali-quantitativi in seguito ad analisi spettrofotometrica. L'analisi elettroforetica del DNA totale ha invece messo in evidenza che i campioni di DNA estratti dai prodotti processati erano più degradati rispetto a quelli ottenuti da prodotti non processati. Infatti, l'esposizione al calore, il basso pH e

L'essiccamento possono indurre depurinazione e idrolisi determinando la frammentazione del DNA (Teletchea, 2009). Questi effetti sono stati ampiamente osservati anche in altri studi (Tabella 6). Inoltre, in questo studio abbiamo confermato l'elevato livello di degradazione del DNA estratto da prodotti freschi/congelati come già osservato da altri autori (Armani *et al.*, 2015; Lamendin *et al.*, 2015).

L'analisi del DNA totale ha permesso di suddividere i campioni in due gruppi in base al livello di degradazione (basso e alto), definito a seconda della lunghezza dei frammenti. In particolare i campioni che mostravano frammenti di DNA più corti di 200 pb sono stati considerati altamente degradati. Questa semplice fase preliminare di valutazione ci ha permesso di accelerare e ridurre il costo dell'analisi ottimizzando la procedura di amplificazione (vedi sezione 8.2.2)

8.2.2 Amplificazione e sequenziamento

In questo studio, utilizzando la coppia di primers PP1, inizialmente selezionata per l'amplificazione dei campioni è stato possibile amplificare solo DNA di pesce. Infatti, utilizzando questa coppia di primers su campioni di DNA di molluschi e crostacei, non è stato possibile ottenere alcun prodotto di PCR, per cui la coppia di primers PP1 è stata in grado di amplificare solo DNA di pesce. Per questa ragione è stata introdotta la coppia di primers proposti da Mikkelsen *et al.* (2006) (PP2) (Tabella 5). Infatti, sebbene i primers universali siano disegnati per amplificare regioni di DNA conservate tra differenti specie, essi non possono assicurare l'amplificazione di DNA di tutti i tipi di organismi appartenenti a diversi *taxa* (Carrera *et al.*, 2000).

Infine, per i campioni di DNA degradati e quando è stato impossibile ottenerne FDB con le suddette coppie di primers, la coppia di primers PP3 è stata utilizzata per l'amplificazione di un MDB. Studi precedenti hanno sottolineato, da una parte, l'impossibilità di ottenere un FDB (~655 pb) nel caso di prodotti processati (Tabella 6) e, dall'altra parte, le potenzialità di MDB nella discriminazione di specie (Armani *et al.*, 2015). Almeno un prodotto di PCR (FDB o MDB) è stato amplificato con una delle coppie di primers per tutti i prodotti campionati, dando un tasso di successo di amplificazione del 100%.

Usando la coppia di primers PP1, è stato possibile amplificare 42 dei 57 campioni di DNA di pesce (74%) (Tabella 4). Un campione di pesce (identificato come *Carcharhinus brachyurus*, Tabella 7) è risultato amplificabile solo con la coppia di primers PP2.

Con la coppia di primers PP2 sono stati amplificati 8 su 11 (73%) campioni di DNA di molluschi e crostacei. Infine, i 18 campioni (sia di pesce che di molluschi) per i quali non è

stato possibile amplificare un FDB, sono stati amplificati con la coppia di primers PP3, dimostrando la potenzialità del primer REVshort1, inizialmente disegnato per gli sparidi (specie Porgies), nell'amplificare DNA di organismi appartenenti a taxa differenti e distanti. Almeno una sequenza è stata ottenuta per 63 prodotti, ottenendo, una percentuale di successo del sequenziamento del 93% (Tabella 4). In totale, 204 sequenze sono state ottenute dai 68 prodotti raccolti. Di queste sequenze, 173 sono state ottenute dai 57 prodotti a base di pesce, 27 dai 10 molluschi e 4 dal crostaceo. Per quanto riguarda i prodotti a base di pesce, è stato ottenuto almeno un FDB, per 42 di essi producendo 133 FDB (lunghezza media 632,6 pb), mentre per altri 11 prodotti sono stati prodotti solo 40 MDB (lunghezza media 139 pb). Nel caso dei molluschi, 21 FDB (lunghezza media 653,9 pb) sono stati ottenuti da 7 prodotti e 6 MDB (lunghezza media 139 pb) dai rimanenti due prodotti. Infine per il crostaceo sono stati prodotti 4 FDB (media 658 pb). Non sono state osservate inserzioni, delezioni o codoni di stop nelle sequenze *COI*. In particolare, nel caso di MDB, non è stata sequenziata nessuna sequenza di DNA nucleare originata da mtDNA (NUMTs), descritta da Zhang & Hewitt (1996).

Come già osservato per l'amplificazione mediante PCR, anche il risultato del sequenziamento è stato influenzato negativamente nel caso di DNA estratto da prodotti sottoposti a calore. Infatti, il trattamento termico (di arrostitimento e di inscatolamento) e l'affumicatura hanno influenzato negativamente il recupero di FDB: nel caso dei 6 prodotti inscatolati è stato possibile ottenere solo MDB (Tabella 3). Una bassa percentuale di amplificazione di FDB è stata osservata anche in studi precedenti (Cawthorn *et al.*, 2012; Haye *et al.*, 2012). Comunque, anche nel caso di prodotti congelati, considerati in questo studio come non processati, il successo di sequenziamento è stato più basso del 100% (Tabella 3). Questo risultato potrebbe essere dovuto ad una certa degradazione che avviene non solo in prodotti processati, ma anche in prodotti freschi e surgelati, anche se in maniera minore (Armani *et al.*, 2015; Lamendin *et al.*, 2015).

8.2.3 Confronto con i database

Utilizzando l'analisi ID su BOLD è stata ottenuta un'identità massima di specie nel range tra 98 e 100% per 172 sequenze (84%) (Tabella 4). Di queste, 115 (67%) sono state identificate in modo inequivocabile a livello di specie, mentre le rimanenti 57 sequenze non sono state identificate a causa della bassa risoluzione del sistema (Tabella 7).

Il sistema è risultato molto più efficiente nell'identificazione di specie di molluschi rispetto ai pesci: tutte le 24 sequenze di molluschi sono state identificate in modo inequivocabile, mentre

solo il 63% delle sequenze sono state identificate nel caso dei pesci (Tabella 7). Questa apparente miglior performance del database di referenza per i molluschi potrebbe paradossalmente essere dovuta al minor numero di studi su questi gruppo tassonomico, poiché attualmente contiene molte meno sequenze rispetto a quelle disponibili per i pesci

Valori inferiori al 98% sono stati ottenuti solo nel caso di specie contenute in prodotti del Bangladesh come *Corica soborna*, *Neotropius acutirostris* e *Otolithoides pama* a causa della mancanza delle sequenze di riferimento

Al contrario, per altri prodotti un'alta corrispondenza è stata ottenuta con specie diverse da quelle riportate in etichetta, nonostante quest'ultime fossero presenti nel database. Per tutti questi l'etichetta è stata considerata non corretta. Considerando separatamente i risultati ottenuti con le analisi ID per FDB e MDB, è possibile osservare che 81 FDB (51.3%) e 34 MDB (74%) hanno permesso una sicura identificazione a livello di specie sul sistema BOLD. Questi risultati confermano il potenziale potere discriminatorio racchiuso nei MDB (Armani *et al.*, 2015) e potrebbero essere correlati ad una più alta variabilità in questa regione del gene.

Con BLAST il massimo punteggio di identità di specie tra 98 e 100% è stato ottenuto per 151 sequenze (74%). Di queste 110 (73%) sono state identificate in modo inequivocabile a livello di specie, mentre le rimanenti 41 sequenze non sono state identificate. Come già detto per BOLD, una migliore identificazione è stato ottenuta per le specie di molluschi rispetto ai pesci (Tabella 7). Come riportato per BOLD, alcuni campioni non sono stati identificati, a causa dell'assenza di sequenze di riferimento. Considerando separatamente i risultati ottenuti con analisi BLAST per le FDB e MDB, abbiamo osservato che 105 FDB (66%) hanno raggiunto un punteggio massimo di identità di specie uguale o maggiore al 98%, e tra queste 82 (52%) potrebbero essere inequivocabilmente attribuite ad una definita specie. Per quanto riguarda MDB, tutte le 46 sequenze (100%) hanno ottenuto punteggi di identità compresi tra il 98 e 100%. Tra questi, 28 MDB (61%) hanno permesso un'identificazione inequivocabile a livello di specie sul database NCBI.

In entrambi i database, in alcuni casi è stata trovata una variabilità intraspecifica maggiore al 2%, soglia considerata effettiva nel distinguere specie differenti (Hebert, Ratnasingham *et al.*, 2003) (evidenziata in grigio in Tabella 7 e descritta in dettaglio in Tabella 8). Anche le analisi su BLAST hanno fornito qualche risultato ambiguo, sebbene riguardi un più basso numero di specie rispetto al database BOLD (3 anziché 8) (Tabella 9). Il confronto tra i risultati di identificazione ottenuti con BOLD e con GenBank mostra che il potere di discriminazione di questi due database è differente a seconda del *barcode* analizzato. In particolare, MDB funziona meglio su BOLD rispetto a GenBank (74% vs 61%).

8.3 Analisi delle informazioni riportate in etichetta

Prima di tutto, è stata verificata la presenza di un'etichetta in italiano, in inglese o in altre lingue. Infatti, secondo il Regolamento (UE) No 1169/2011, il linguaggio usato nell'etichetta deve essere intelligibile per i consumatori per facilitare la comprensione delle informazioni. È stato osservato che l'etichetta in italiano era presente nell'87% dei casi (59/68), mentre il 4% dei prodotti aveva solo un'etichetta in inglese e il rimanente 9% in altre lingue (principalmente cinese) (Tabella 10). In seguito è stata verificata la corrispondenza tra il nome commerciale e il nome scientifico, consultando sia la lista ufficiale del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali (MIPAAF, 2008) che la lista di denominazioni provvisorie proposte dalla regione Veneto (<http://www.izsvenezie.it/documenti/temi/identificazione-specie-ittiche/catalogo-specie-ittiche/denominazione-prodottipesca-veneto.pdf>). È da notare che il numero totale dei nomi scientifici e commerciali (75) è più alto rispetto a quello dei prodotti raccolti, poiché uno dei prodotti conteneva un mix di 8 specie. La corrispondenza tra nome commerciale e quello scientifico si è osservata nel 40% dei casi (30/75) mentre nel 29% dei casi non c'era corrispondenza (22/75); nel rimanente 31% (23/75) una o entrambe le denominazioni erano assenti (Tabella 10).

Il 37% dei prodotti non riportava l'area di pesca, non rispettando i requisiti europei. Gli altri prodotti derivavano dalle aree FAO 61 (n=32), 04 (8), 57 (1), 71 (1) e 87 (1) (Tabella 10). Nonostante una precedente indagine avesse rilevato che solo poche specie abitualmente commercializzate sul mercato italiano originassero dalla Zona FAO 61 (NW, Pacifico), va notato l'alto tasso di prodotti etnici provenienti da questa zona. a rischio per la presenza di contaminanti radioattivi, a causa della fuoriuscita di acque contaminate nel Mare Cinese dopo l'incidente nucleare del marzo 2011 a Fukushima, in Giappone.

In generale, il 66% dei prodotti presentava un'etichettatura non conforme. Considerando l'alta percentuale di etichette non conformi trovate (79% nei prodotti cinesi e 54% nei prodotti provenienti dal Bangladesh) abbiamo deciso di verificare l'origine dei prodotti

consultato la lista ufficiale riportante gli stabilimenti approvate per l'importazione da Cina (https://webgate.ec.europa.eu/sanco/traces/output/CN/FFP_CN_en.pdf), Bangladesh
(https://webgate.ec.europa.eu/sanco/traces/output/BD/FFP_BD_en.pdf), Indonesia
(https://webgate.ec.europa.eu/sanco/traces/output/ID/FFP_ID_en.pdf), Birmania
(http://fishexporters.org/index.php?option¼com_content&view¼article&id¼19&Itemid¼122) e Vietnam (https://webgate.ec.europa.eu/sanco/traces/output/VN/FFP_VN_en.pdf).

Sulla base delle informazioni verificabili, tutti i prodotti acquistati in negozi cinesi provenivano dalla Cina (principalmente dalla provincia di Zhejiang), mentre gli 11 prodotti acquistati in negozi bengalesi erano variamente distribuiti: 6 erano stati prodotti in Bangladesh, 3 in Birmania, 1 in Indonesia e 1 in Vietnam. È interessante notare che mentre tutti i prodotti bengalesi derivavano da impianti approvati, 23 prodotti cinesi riportavano un impianto non incluso nella lista ufficiale. Questo dato suggerisce un possibile importo “paralegale” di prodotti cinesi al fianco di importazioni legali (Armani *et al.*, 2011; Pramod *et al.*, 2014) ed è supportato dal fatto che entrambi i prodotti (ETN 39 e 43) contenenti pesce palla tossico provenivano da stabilimenti “non approvati”.

Inoltre, un altro problema associato ai prodotti ittici venduti all'interno dei negozi etnici al dettaglio è legato alla cosiddetta importazione personale. Pertanto, gli operatori del settore alimentare che gestiscono un negozio di vendita al dettaglio etnico possono mettere sul mercato questo tipo di prodotti. In effetti, il 91% dei prodotti cinesi provenienti da impianti approvati presentavano le etichette QS (Qualità e Sicurezza), richieste per la vendita di prodotti nel territorio della Repubblica Popolare Cinese (<http://www.asianlii.org/cn/legis/cen/laws/irftsaaotqsotfmapet1398/>), invece della CIQ (*China Inspection Quarantine*), la quale dovrebbe essere riportata sul prodotto alimentare cinese certificato per l'esportazione (http://search.mofcom.gov.cn/swb/recordShow.jsp?flag%40&lang%41&base%4iflow_4&id%4english200709050919481&value%4%28Announcement%20and%2085%20and%202007%29). I rimanenti 2 prodotti derivanti da stabilimenti non approvati non mostravano alcuna etichetta.

8.4 Confronto tra le analisi molecolari e le informazioni riportate in etichetta

Nel complesso, 33 prodotti su 68 (48,5%) sono risultati mal etichettati mettendo in evidenza la presenza di frodi. In particolare, 5 degli 11 prodotti del Bangladesh (45%) e 28 dei 57 prodotti cinesi (49%) (Tabella 7; Tabella 10). Inoltre, 3 prodotti tra i *mislabelled* contenevano specie appartenenti al genere *Carcharhinus* spp., considerato dall'*International Union for Conservation of Nature* (IUCN) come quasi a rischio (Tabella 8). Infine, i risultati dell'analisi molecolare dei prodotti specificatamente identificati sono stati confrontati con la zona di cattura riportata sull'etichetta: il 3% ha mostrato una discrepanza tra la zona di cattura e l'habitat geografico delle specie identificate dall'analisi molecolare.

Sulla base dell'analisi effettuata per valutare l'habitat di appartenenza delle specie inequivocabilmente identificate attraverso l'analisi molecolare è stato visto che mentre quelle presenti nei prodotti cinesi erano per lo più marine (17 VS 1 di acqua dolce), le specie identificate nei prodotti bengalesi provenivano principalmente da habitat d'acqua dolce (9 VS 2 da acqua marina) (Armani *et al.*, 2015).

8.5 Implicazioni per la salute

Potenziati rischi per la salute sono stati evidenziati in 2 campioni etichettati come calamari ma individuati a livello di genere come pesce palla, *Lagocephalus* spp. L'impossibilità di effettuare una diagnosi specifica utilizzando la metodica del DNA *barcoding* non rappresenta un limite per l'obiettivo del nostro studio, considerando che, secondo le norme europee vigenti (Reg.(CE) 853/2004; Reg. (CE) 854/2004), tutti i pesci appartenenti alla famiglia dei Tetraodontidae non devono essere immessi sul mercato comunitario.

I Tetraodontidae, comprendenti 27 Generi e 196 Specie (FishBase), sono comunemente conosciuti come “pesci palla” (*puffersfish* nei paesi anglosassoni e *fugu* in Giappone) in quanto possiedono la capacità di gonfiare il proprio corpo immettendo aria o acqua in un ampio diverticolo ventrale dello stomaco; in questo modo riescono sia a intimidire eventuali predatori che a rendere difficoltosa l'ingestione per l'aumento di volume. Se non si sentono minacciati hanno corpo tozzo e ovoidale, con profilo tondeggiante anteriormente; la testa è tozza e larga; sul corpo non sono presenti vere e proprie squame e possono essere presenti placche o scudetti ossei, o piccole spine; la bocca è piccola e terminale con dentatura a forma di becco poiché entrambe le mascelle posseggono due placche, risultanti dalla fusione di denti, separati da una sutura centrale (da tale caratteristica ne deriva il nome della famiglia); La concentrazione della tossina (tetrodotossina, TTX) è maggiore nel fegato, nelle gonadi, nella pelle e nell'intestino del pesce rispetto a quella nella muscolatura dello stesso soggetto (che spesso ne è completamente priva) e aumenta in concomitanza del periodo riproduttivo; tuttavia, frequente è la contaminazione delle carni in seguito ad errata toelettatura o per eccessiva conservazione (Manzoni e Tepedino, 2008, *Grande enciclopedia illustrata dei pesci*). La tossina è stata scoperta nel 1909 dal Dr. Yoshizumi Tahara dalle ovaie di pesce scatola (Suehiro *et al.*, 1993), anche se la tossicità dei puffer fish era conosciuta da lungo tempo. La TTX è una neurotossina molto potente che si trova in molte varietà di specie marine ed anche in alcuni terrestri (Bane *et al.*, 2014) e possiede una tossicità oltre mille volte maggiore rispetto al cianuro; non si conoscono antidoti (Saoudi *et al.*, 2010). È stato anche

dimostrato che la fonte di TTX in pesce palla è un batterio endo-simbiotico che abita naturalmente l'intestino dell'animale. Il pesce palla infatti, potrebbe inizialmente acquistare la TTX da batteri che producono la tossina tramite la rete alimentare e che questi batteri poi persistono nel pesce (Noguchi & Arakawa, 2008). Infatti diverse varietà di batteri ubiquitari producono la TTX tra cui alcuni appartenenti ai generi *Nocardia*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* e *Moraxella* (Lehane & Lewis, 2000) La TTX è una molecola non alcaloidea, a struttura aminoperidrochinazolinica, di basso peso molecolare con una struttura a gabbia unica e formula bruta $C_{11}H_{17}N_3O_8$, possiede un gruppo funzionale guanidico carico positivamente, attraverso il quale si lega saldamente a una proteina (proteina canale) di membrana, attraverso un gruppo carbossilico ionizzato (COO), carico negativamente (Melis, 2014, Additivi e tossici negli alimenti). La molecola esplica la sua azione tossica legandosi ai canali del sodio di muscoli e nervi della vittima determinandone il blocco (Denac *et al.*, 2000). Negli esseri umani l'insorgenza e la gravità dei sintomi di avvelenamento TTX dopo l'ingestione è dose-dipendente (Islam *et al.*, 2008). I sintomi iniziali includono formicolio (parestesie) della lingua e delle labbra, seguite da mal di testa e vomito, che può progredire a debolezza muscolare e atassia. Nei casi più gravi la morte può verificarsi per insufficienza respiratoria e cardiaca (How *et al.*, 2003). L'unico trattamento per l'intossicazione da TTX è l'osservazione e cure di supporto appropriate (Noguchi & Ebesu, 2001).

In passato, il problema legato alla TTX era considerato limitato al Giappone e ai paesi asiatici; ma oggi il problema sta emergendo in altri Paesi in seguito all'aumento della temperatura dell'acqua in tutto il mondo (Danovaro *et al.*, 2009) e ai crescenti scambi commerciali con i Paesi asiatici. (http://legxv.camera.it/cartellecomuni/leg14/RapportoAttivitaCommissioni/testi/14/14_cap10_sch02.htm). Infatti, incidenti relativi ad avvelenamento da pesci palla sono stati segnalati all'interno Paesi della regione indo-pacifica occidentale: Giappone, Cina, Taiwan, Filippine, Thailandia e Bangladesh (Hwang & Noguchi, 2007). Negli Stati Uniti, l'importazione legale del pesce palla è limitata a un singolo importatore giapponese certificato dal Ministero giapponese per la Salute e il benessere (<http://www.fda.gov/InternationalPrograms/Agreements/MemorandaofUnderstanding/ucm107601.htm>).

Tuttavia, i casi precedenti di avvelenamento da TTX dimostrano che l'importazione illegale di pesce palla negli Stati Uniti continua in risposta alla domanda dei consumatori (*Centers for Disease Control and Prevention*, 1996; Coehn *et al.*, 2009). In particolare, nel 2007, 2 persone si sono ammalate dopo il consumo di pesce palla importati dalla Cina (Cohen *et al.*,

2009). In Italia, il primo e unico caso di morte dovuta ad ingestione di queste specie velenose era stato registrato nel 1997, quando 3 persone avevano consumato filetti congelati di "coda di rospo" che erano stati fraudolentemente sostituiti con "coda di pesce palla" (probabilmente *L. lunaris*) importata dal Taiwan. (<http://www.izsvenezie.it/temi/tecnologia-innovazione/identificazione-di-specie-ittiche/>) Un analogo incidente si è verificato a Pavia (tre casi) in seguito al consumo di pesci congelati (<http://www.ilfattoalimentare.it/italia-pesce-palla-velenoso-scatta-allerta-sicilia-autorita-non-vogliono-diffondere-notizia.html>). Altri tentativi di commercializzare queste specie sono stati segnalati in molte regioni italiane nel corso degli anni successivi (Pucci, 2014). Il rischio associato all'importazione di queste specie tossiche potrebbe aumentare, visto che, negli ultimi anni, il pesce palla d'allevamento è diventato sempre più popolare (Tao *et al.*, 2012).

Questi ripetuti ritrovamenti potrebbero essere anche dovuti al fatto che i negozi alimentari etnici e ristoranti sono oggi frequentati da consumatori appartenenti a diverse nazionalità, inclusi gli italiani, a causa di un cambiamento dei gusti alimentari e per i prezzi più bassi. Infatti, anche in conseguenza della recente recessione economica, il consumo di prodotti etnici è aumentata tanto che alcuni di questi prodotti stanno comparando in molti mercati distrettuali.

Infine da non sottovalutare il rinvenimento nei mari italiani specie appartenenti a questa famiglia arrivate attraverso il Canale Suez. Le prime segnalazioni di pesci palla non autoctoni nel Mediterraneo risalgono al 2003, da parte di un veterinario dell'ASL di Gaeta, seguite da altri report in Campania, Puglia, Sicilia e Sardegna (<http://www.ilfattoalimentare.it/pesci-palla-velenosi-mediterraneo-da-dove-arrivano-quali-rischi.html>). In particolare, la specie maggiormente segnalata è il *Lagocephalus sceleratus*, originaria del Mar Rosso, migrata attraverso il Canale di Suez (migrazione lessepsiana) e riportata per la prima volta nel Mediterraneo in Turchia (Akyol *et al.*, 2005), poi in Israele (Eisenman *et al.*, 2008), in Grecia (Kasapidis *et al.*, 2007; Corsini *et al.*, 2006) e infine nel novembre 2013 nella zona di Lampedusa (<http://www.ilfattoalimentare.it/wp-content/uploads/2013/11/ispra-manifesto-porti.pdf>).

La vendita di questi pesci tossici per il consumo domestico o la preparazione commerciale mette i consumatori, che possono non essere a conoscenza dell'illegalità della vendita, a rischio di avvelenamento da tetrodotossina. Infatti, anche se alcune incongruenze nell'etichettatura sono dovute a volte alla mera negligenza, altre volte possono essere dovute a una modifica premeditata delle informazioni riportate con lo scopo di eludere la normativa relativa all'importazione.

Conclusioni

In questa tesi, la metodica del DNA *barcoding* è stato utilizzato per valutare la informazioni riportate sulle etichette dei prodotti ittici etnici raccolti nei negozi cinesi e bengalesi. I risultati ottenuti hanno confermato l'attendibilità della metodica, sia utilizzando FDB che MDB nell'identificazione dei pesci. Questo, anche in caso di prodotti trasformati. Complessivamente, la metodica ha messo in evidenza un i etichettatura non corretta nel 48,5% dei casi. Da sottolineare che, in 2 casi, è stato messo in evidenza la presenza di specie ittiche tossiche appartenenti alla famiglia Tetraodontidae. Pertanto, questo lavoro ha confermato che l'ispezione molecolare di prodotti ittici dovrebbe essere solitamente usata come supporto per il controllo ufficiale per garantire la conformità alle normative vigenti e la salute dei consumatori.

Bibliografia

- “*Bacchette e forchette: la diffusione della cucina cinese in Italia*”, Federica Redi, 2007
- “*La comunità cinese a Trieste. Dinamiche imprenditoriali tra ristoranti e pronto moda*” Quaderni del Dipartimento di Economia, Società e Territorio, 2005
- «Les Chinois de Paris depuis le début du siècle. Présence urbaine et activités économiques» in *Revue Européenne des Migrations Internationales, La Diaspora Chinoise en Occident*, 3, VIII, 1992, pp. 155-74.
- AA.VV., *Cina a Milano. Famiglie, ambienti e lavori della popolazione cinese a Milano*, Abitare Segesta, Milano, 1997
- Adams, C., 1994, *Across seven seas and thirteen rivers: life stories of pioneers Sylhety settlers in Britain*, London, Eastside Books (I ed. London 1987)
- Adler, C. J., Haak, W., Donlon, D., Cooper, A., & Genographic Consortium. (2011). Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *Journal of Archaeological Science*, 38(5), 956-964.
- Ahmed, G. U., Islam, M. F., Khan, M. N. A., Haque, M. M., & Kibria, M. G. (1997). Culture feasibility of African catfish (*Clarias gariepinus* lin.) fry in glass tank and synthetic hapa system using supplemental diets.
- Akasaki T, Yanagimoto T, Yamakami K, Tomonaga H, Sato S. 2006. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome *b* gene in cod fish (order Gadiformes) products. *J Food Sci* 71(3), 190–5.
- Akyol, O., U`nal, V., Ceyhan, T., Bilecenoglu, M., 2005. First confirmed record of *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) in the Mediterranean Sea. *J. Fish. Biol.* 66 (4), 1183–1186
- Ames, B.N., 2004. Delaying the mitochondrial decay of aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1019 (1), 406–411.
- April, J., Mayden, R. L., Hanner, R. H., & Bernatchez, L. (2011). Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), 10602e10607.
- Ardura, A., Planes, S., & Garcia-Vazquez, E. (2013). Applications of DNA barcoding to fish landings: authentication and diversity assessment. *ZooKeys*, 365, 49.

- Armani, A., Castigliero, L., Guidi, A., Tinacci, L., & Gianfaldoni, D. (2011). Molecular characterization of Chinese imported fish (Icefish). *Italian Journal of Food Safety*, 1(1zero), 191-195.
- Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., & Guidi, A. (2011a). Molecular characterization of icefish (*Salangidae* family), using direct sequencing of mitochondrial cytochrome b gene. *Food Control*, 22, 888e895.
- Armani, A., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., & Guidi, A. (2012). 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), 184-192.
- Armani, A., D'Amico, P., Castigliero, L., Betti, B., Gianfaldoni, D., Guidi, A., et al. (2012a). I prodotti ittici dopo Fukushima: le garanzie di sicurezza per il consumatore comunitario. *Industrie alimentari*, 527, 19e27.
- 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 Research International*, 54(2), 1383e1393.
- Armani, A., Tinacci, L., Xiong, X., Titarenko, E., Guidi, A., & Castigliero, L. (2014). Development of a simple and cost-effective bead-milling method for DNA extraction from fish muscles. *Food Analytical Methods*, 7, 946e955.
- Armani, A., Guardone, L., Castigliero, L., D'Amico, P., Messina, A., Malandra, R., et al. (2015). DNA and Mini-DNA Barcoding for the identification of Porgies species (family *Sparidae*) of commercial interest on the international market. *Food Control*, 50, 589e596.
- Armani, A., Guardone, L., La Castellana, R., Gianfaldoni, D., Guidi, A., & Castigliero, L. (2015a). DNA barcoding reveals commercial and health issues in ethnic seafood sold on the Italian market. *Food Control*, 55, 206-214.
- Asensio L, Gonzalez I, Rodriguez MA, Mayoral B, Lopez-Calleja I, Hernandez PE, Garcia T, Martin R., 2003. Identification of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets by polyclonal antibody-based enzymelinked immunosorbent assay. *J Agric Food Chem* 51 (5), 1169–72.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., ... & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 489-522.

- Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O'Riordan, A., & Furey, A. (2014). Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins*,6(2), 693-755.
- Barbuto, M., Galimberti, A., Ferri, E., Labra, M., Malandra, R., Galli, P., et al. (2010). DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: the Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International*, 43, 376e381.
- Barlett SE, Davidson WS., (1992). FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Bio Tech* 12 (3), 408–11.
- Bartlett, S.E. and Davidson, W.S. (1991) 'Identification of *Thunnus* Tuna Species by the Polymerase Chain Reaction and Direct Sequence Analysis of their Mitochondrial Cytochrome b Genes' in *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 48, 309±317 1
- Beaman, K. V. (Ed.). (2004). *Out of Site: An Inside Look at HR Outsourcing*. Rector-Duncan.
- Bertinelli, R., *Economia e politica nella Cina contemporanea*, Roma, La Nuova Italia Scientifica, 1990.
- Borgo, R., SOUTY-GROSSET, C., Bouchon, D., & Gomot, L. (1996). PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA for Identification of Snail Meat Species. *Journal of Food Science*, 61(1), 1-4.
- Camera di Commercio, Industria, Artigianato e Agricoltura di Prato, 2003. URL: http://www.po.camcom.it/doc/public/2003/str_03.pdf
- CAMPANI, G., CARCHEDI, F., TASSINARI, A. (a cura di), *L'immigrazione silenziosa. Le comunità cinesi in Italia*, Torino, Edizioni della Fondazione Giovanni Agnelli, 1994
- Campani, M., & Verri, A. (1992). *Motion analysis from first-order properties of optical flow*. *CVGIP: Image Understanding*, 56(1), 90-107.
- CANDRIAN, U. Die Polymerasen-Kettenreaktion in der Lebensmittelanalytik. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 85, 704–718 (1994)
- Carrera E, Garcia T, Cespedes A, Gonzalez I, Sanz B, Hernandez P, Martin R., 1997. Immunostick colorimetric ELISA assay for the identification of smoked salmon (*Salmo salar*), trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama raii*). *J Sci Food Agric* 74, 547–50.
- Carrera, E., Garcia, T., Cespedes, A., Gonzalez, I., Fernandez, A., Asensio, L. M., et al. (2000). Identification of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-restriction fragment length polymorphism of the p53 gene. *Journal of AOAC International*, 83(2), 341e346.
- Carvalho, D. C., Neto, D. A., Brasil, B. S., & Oliveira, D. A. (2011). DNA barcoding unveils a high rate of mislabeling in a commercial freshwater catfish from Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(sup1), 97-105.
 - Carvalho, D. C., Palhares, R. M., Drummond, M. G., & Frigo, T. B. (2015). DNA barcoding identification of commercialized seafood in South Brazil: a governmental regulatory forensic program. *Food Control*, 50, 784e788.
 - 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, 30e40.
 - Ceccagno, A. (Ed.). (2003). *Migranti a Prato: Il distretto tessile multietnico* (Vol. 423). Franco Angeli.
 - Centers for Disease Control and Prevention. (1996). Tetrodotoxin poisoning associated with eating puffer fish transported from Japan-California, 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 45, 389e391.
 - Cespedes, A., Garcia, T., Carrera, E., Gonzalez, I., Fernandez, I., Asensio, L., Hernandez, P.E. and Martin, R., 1999. Genetic discrimination among *Solea solea* and *Microchirus azevia* by RFLP analysis of PCR amplified mitochondrial DNA fragments. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 50, 49–72
 - CHIKUNI, K., OZUTSUMI, K., KOISHIKAWA, T. AND KATO, S. Species identification of cooked meats by DNA hybridization assay. *Meat Science*, 27, 119–128 (1990) 23
 - Choudhury, Y. (1993). *The Roots and Tales of the Bangladeshi Settlers*. Sylheti Social History Group.
 - Chulanetra, M., Sookrung, N., Srimanote, P., Indrawattana, N., Thanongsaksrikul, J., Sakolvaree, Y., et al. (2011). Toxic Marine puffer fish in Thailand seas and tetrodotoxin they contained. *Toxins*, 3, 1249e1262.
 - Circular of the Italian Minister of Agriculture, Food and Forestry (MIPAAF) n. 21329 of May 27. (2002). Subject: Reg. 2065/2001 of the Commission of 22 October 2001 of 22 October 2001 laying down detailed rules for the implementation of Regulation (CE) 104/2000, as regards information to consumers in the field of fisheries and aquaculture. Ministerial Decree of 27 March 2002.

- Civera, T., 2003. Species Identification and Safety of Fish Products. *Veterinary Research Communication*, 27 (Suppl.1), 481-489.
- Cohen, N. J., Deeds, J. R., Wong, E. S., Hanner, R. H., Yancy, H. F., White, K. D., et al. (2009). Public health response to puffer fish (tetrodotoxin) poisoning from mislabeled product. *Journal of Food Protection*, 72(4), 810e817.
- Colavita G. (2012), Frodi alimentari, tecniche ispettive, aspetti tecnici e giuridici,. Ed. Point Vétérinaire Italie
- Comando Carabinieri per la Tutela della Salute, 2011/2012
- Commission Regulation (EC) No 206/2009 of 5 March 2009 on the introduction into the Community of personal consignments of products of animal origin and amending Regulation (EC) No 136/2004. *Official Journal of the European Union*, L77.
- Corsini, M., Margies, P., Kondilatos, G., Economidis, P.S., 2006. Three new exotic fish records from the SE Aegean Greek waters. *Sci. Mar.* 70, 319–323
- Council Regulation (EC) No 104/2000 of 17 December 1999 on the common organization of the markets in the fishery and aquaculture products. *Official Journal of the European Communities*, L17.
- Cutarelli, A., Amoroso, M. G., De Roma, A., Girardi, S., Galiero, G., Guarino, A., et al. (2014). Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. *Food Control*, 37, 46e50.
- D'Amico, P., Armani, A., Castigliero, L., Sheng, G., Gianfaldoni, D., & Guidi, A. (2014). Seafood traceability issues in Chinese food business activities in the light of the European provisions. *Food Control*, 35(1), 7-13.
- Danovaro, R., Fonda Umani, S., & Pusceddu, A. (2009). Climate change and the potential spreading of marine mucilage and microbial pathogens in the Mediterranean Sea. *PLoS One*, 4(9), e7006.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., & Traganos, F. (1997). Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27(1), 1-20.
- 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.
- De Giorgi, *Dalla Cina a Vicenza, caratteristiche del flusso migratorio cinese verso l'Europa e l'Italia*, pp. 2-6, in Associazione artigiani della provincia di Vicenza, L'imprenditoria degli immigrati cinesi, Vicenza, 2002

- Deagle, B. E., Eveson, J. P., & Jarman, S. N. (2006). Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples—a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3(1), 11.
- Denac, H., Mevissen, M., & Scholtysik, G. (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 362(6), 453-479.
- DeSalle, R., Egan, M. G., & Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1905-1916.
- Di Pinto, A., Di Pinto, P., Terio, V., Bozzo, G., Bonerba, E., Ceci, E., & Tantillo, G. (2013). DNA barcoding for detecting market substitution in salted cod fillets and battered cod chunks. *Food chemistry*, 141(3), 1757-1762.
- DoF . 2003 . Brief on Department of Fisheries Bangladesh. Department of Fisheries, Ministry of Fisheries and Livestock, Dhaka, Bangladesh
- DoF . 2005 . Fishery Statistical Yearbook of Bangladesh 2003–2004. Fisheries Resources Survey System, Department of Fisheries, Ministry of Fisheries and Livestock, Matshya Bhaban, Dhaka, 46 pp.
- Dossier Statistico Immigrazione Caritas-Migrantes 2010
- Eade, J., Drinkwater, S. and Garapich, M. (2006) ‘Class and Ethnicity: Polish; Migrants in London’, ESRC final report at www.surrey.ac.uk/Arts/CRONEM
- EBBEHØJ, K. F. AND THOMSON, P. D. Species differentiation of treated meat products by DNA hybridisation. *Meat Science*, 30, 221–234 (1991) 22
- Eglinton, G., Logan, G. A., Ambler, R. P., Boon, J. J., & Perizonius, W. R. K. (1991). Molecular preservation [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 333(1268), 315-328.
- Eisenman, A., Rusetski, V., Sharivker, D., Yona, Z., Golani, D., 2008. An odd pilgrim in the holyland. *Am. J. Emerg. Med* 26 (3), 383.e3–383.e6
- Ercsey-Ravasz, M., Toroczkai, Z., Lakner, Z., & Baranyi, J. (2012). Complexity of the international agro-food trade network and its impact on food safety. *PLoS One*, 7(5), e37810.
- Espiñeira, M., González-Lavín, N., Vieites, J. M., & Santaclara, F. J. (2008). Development of a method for the genetic identification of flatfish species on the basis of mitochondrial DNA sequences. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(19), 8954-8961.

- EUMOFA. (2014). European market observatory for fisheries and aquaculture products (2014 ed.). The EU Fish Market. Available at <http://ec.europa.eu/fisheries/market-observatory> Accessed 21.11.14.
- FAO 2005-2015. National Aquaculture Sector Overview. Bangladesh. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Text by Gias, U.A. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 1 January 2005. [Cited 2 October 2015]
- FAO. (2014). The state of world fisheries and aquaculture 2014: Opportunities and challenges. Available at <http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf> Accessed 21.11.14.
- FAO. (2014b). ASFIS list of species for fishery statistics purposes. Available at <http://www.fao.org/fishery/collection/asfis/en>.
- Ficetola, G. F., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessière, J., ... & Pompanon, F. (2010). An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *Bmc Genomics*, 11(1), 434.
- Focà A., Lamberti A. G. (2003). Metodiche estrattive per la preparazione dei campioni. Roche_Diagnostics pubblicazioni, EsaDia No. 13, 50 – 53.
- Fondazione Leone Moressa (2010). L'influsso della cucina etnica sulle abitudini alimentari degli italiani. Available at http://www.fondazioneleonemoressa.org/newsite/wp-content/uploads/2010/10/comunicato_54.pdf Accessed 21.11.14.
- Food and Agriculture Organisation (FAO), 2002. Global Agro-ecological Assessment for Agriculture in the 21st Century: Methodology and Results, Food and Agriculture Organisation, Rome, Italy
- Frézal, L. & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727-736.
- G. De Giovanni (2005): Le etichette dei prodotti alimentari Edizione de Il Sole 24 Ore di Bologna
- Galal-Khallaf, A., Ardura, A., Mohammed-Geba, K., Borrell, Y. J., & Garcia-Vazquez, E. (2014). DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control*, 46, 441e445.
- George O. Poinar, Jr., *Frontiere della Vita* (1998) Department of Entomology Oregon State University Corvallis, Oregon, USA
- Grant, W. A. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89(5), 415-426.

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, pp. 95e98).
- Handy, S. M., Deeds, J. R., Ivanova, N. V., Hebert, P. D. N., Hanner, R. H., Ormos, A., et al. (2011). A single-laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 94, 201e210.
- Hansen, A. J., Mitchell, D. L., Wiuf, C., Paniker, L., Brand, T. B., Binladen, J., ... & Willerslev, E. (2006). Crosslinks rather than strand breaks determine access to ancient DNA sequences from frozen sediments. *Genetics*, 173(2), 1175-1179.
- Hasan, M. R. (2001). Demand-led research and management of wild freshwater fish in Bangladesh. *Support of University Fisheries Education and Research, Dhaka, Bangladesh*.
- Haye, P. A., Segovia, N. I., Vera, R., Gallardo, M. D. L._A., & Gallardo-Esc_arate, C. (2012). Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA barcoding. *Food Control*, 25(1), 239e244.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR , 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270, 313–321
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96-S99.
- Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*, 2, 1657-1663.
- Holmes, B. H., Steinke, D., & Ward, R. D. (2009). Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 95(2), 280e288.
- Hossain, M.M. 2003 . Quality control program for the extension of export business. In: *Fish Fortnight Compendium*. Department of Fisheries, Ministry of Fisheries and Livestock, Bangladesh. 31–33 pp.
- How C.-K., Chern C.-H., Huang Y.-C., Wang L.-M., Lee C.-H. Tetrodotoxin poisoning. *Am. J. Emerg. Med.* 2003;21:51–54. doi: 10.1053/ajem.2003.50008
- Hu, Y., Yuan, C., Yu, K., Qu, Y., Chen, S., Wang, X., et al. (2014). An online survey study of consumer preferences on aquatic products in China: current seafood consumption patterns and trends. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 5(2).

- Hwang, D. F., & Noguchi, T. (2007). Tetrodotoxin poisoning. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 141e236.
- Islam Q.T., Razzak M.A., Islam M.A., Bari M.I., Basher A., Chowdhury F.R., Sayeduzzaman A.B.M., Ahasan H.A.M.N., Faiz M.A., Arakawa O., et al. Puffer fish poisoning in Bangladesh: Clinical and toxicological results from large outbreaks in 2008. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2011;105:74–80. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.10.002
- ISTAT, National Institute of Statistics. (2011). La popolazione straniera presente in Italia. Available at <http://www.istat.it/it/archivio/39726> Accessed 21.11.14.
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 544-548.
- Jacquet, J. L., & Pauly, D. (2008). Trade secrets: renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy*, 32(3), 309-318.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Jérôme, M., Martinsohn, J. T., Ortega, D., Carreau, P., Verrez-Bagnis, V., & Mouchel, O. (2008). Toward fish and seafood traceability: anchovy species determination in fish products by molecular markers and support through a public domain database. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(10), 3460-3469.
- Kasapidis, P., Peristeraki, P., Tserpes, G., & Magoulas, A. (2007). First record of the lessepsian migrant *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin 1789)(Osteichthyes: Tetraodontidae) in the cretan sea (Aegean, Greece). *Aquatic invasions*, 2(1), 71-73.
- King, R. e Rybaczuk, K 1993, Southern Europe and the international division of labour: from emigration to immigration. In King, R. (ed.), *The New Geography of European Migrations*. London: Belhaven, 175-206.
- Knights, M. (1996). Bangladeshi immigrants in Italy: from geopolitics to micropolitics. *Transactions of the Institute of British Geographers*, 105-123.
- Kyle, C. J., & Wilson, C. C. (2007). Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species. *Forensic Science International*, 166(1), 68-76.
- La Comunità Bengalese in Italia, Direzione Generale Dell'immiGrazione e Delle Politiche Di integrazione, *Rapporto annuale sulla presenza degli immigrati – 2013*
- LA COMUNITÀ CINESE IN ITALIA, Direzione Generale Dell'immigrazione e Delle Politiche Di integrazione, Abstract del Rapporto annuale sulla presenza degli immigrati – 2014).

- Lamendin, R., Miller, K., & Ward, R. D. (2015). Labeling accuracy in Tasmanian seafood: an investigation using DNA barcoding. *Food Control*, 47, 436e443.
- Landi, M., Dimech, M., Arculeo, M., Biondo, G., Martins, R., Carneiro, M., et al. (2014). DNA barcoding for species assignment: the case of Mediterranean Marine fishes. *PLoS One*, 9(9), e106135.
- Lee, J. H., Hwang, J., & Mustapha, A. (2014). Popular ethnic foods in the United States: a historical and safety perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 2e17.
- Lehane, L., & Lewis, R. J. (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International journal of food microbiology*, 61(2), 91-125.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *nature*, 362(6422), 709-715.
- Lindahl, T., & Andersson, A. (1972). Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11(19), 3618-3623.
- Lindahl, T., & Nyberg, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11(19), 3610-3618.
- Lowenstein, J. H., Burger, J., Jeitner, C. W., Amato, G., Kolokotronis, S. O., & Gochfeld, M. (2010). DNA barcodes reveal species-specific mercury levels in tuna sushi that pose a health risk to consumers. *Biology Letters*, 6(5), 692-695.
- M.L.P.S., Ministero del Lavoro e delle Politiche Sociali. (2013). La Comunit_a Bengalese in Italia. Rapporto annuale sulla presenza degli immigrati e 2013. Available at http://www.integrazionemigranti.gov.it/Attualita/ILPunto/Documents/2013%20-%20Comunita%20Bengalese%20v_0.pdf Accessed 21.11.14.
- Mackie IM, Pryde SE, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Perez-Martin RI, Quinteiro J, Rey-Mendez M, Rehbein H., 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci Technol* , 10, 9–14.
- Manzoni P. e Tepedino V., “Grande enciclopedia illustrata dei pesci”, 2008, Ed. Eurofishmarket, Bologna, Italy
- Martinez, I., James, D., & Loréal, H. (2005). Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity.
- Melis M., “Additivi e tossici negli alimenti” ,2014, libreriauniversitaria.it edizioni Webster srl, Padova, Italy
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology*, 3(12), 2229.

- Mikkelsen, P. M., Bieler, R., Kappner, I., & Rawlings, T. A. (2006). Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 148(3), 439e521.
- MIPAF. (2008). Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 31 gennaio 2008 (G.U. n. 45 del 22 febbraio 2008) e successive integrazioni fino al decreto 19 novembre 2012 (G.U. n. 27 del 1 febbraio 2013). Available at <http://www.izsvenezie.it/documenti/temi/identificazione-specie-ittiche/catalogospecie-ittiche/denominazione-latina-specie-ittiche-di-interesse-commerciale.pdf>.
- Mohan Dey, M., Rab, M. A., Paraguas, F. J., Piumsombun, S., Bhatta, R., Ferdous Alam, M., & Ahmed, M. (2005). Fish consumption and food security: a disaggregated analysis by types of fish and classes of consumers in selected Asian countries. *Aquaculture Economics & Management*, 9(1-2), 89-111.
- Moretti VM, Turchini GM, Bellagamba F, Caprino F. 2003. Traceability issues in fishery and aquaculture products. *Vet Res Com* 27 (Suppl 1), 497–505.
- Mosher, H. S., & Fuhrman, F. A. (1984). Occurrence and origin of tetrodotoxin. In E. P. Ragelis (Ed.), *Seafood toxins* (pp. 333e344). Washington, DC: American Chemical Society.
- Noguchi & Ebesu J.S.M. Puffer poisoning: Epidemiology and treatment. *Toxin Rev.* 2001;20:1–10. doi: 10.1081/TXR-100103080
- Noguchi, T., & Arakawa, O. (2008). Tetrodotoxin–distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. *Marine drugs*, 6(2), 220-242.
- Osmani, S. R. (1986). Bangladesh. Migration of Asian Workers to the Arab World, 23-65.
- Ottoni, C., Koon, H. E., Collins, M. J., Penkman, K. E., Rickards, O., & Craig, O. E. (2009). Preservation of ancient DNA in thermally damaged archaeological bone. *Naturwissenschaften*, 96(2), 267-278.
- Pignatti, (2012) Bangladesh: dove la globalizzazione non basta .URL: <http://www.imille.org/2012/09/bangladesh-dove-la-globalizzazione-basta/>
- Pramod, G., Nakamura, K., Pitcher, T. J., & Delagran, L. (2014). Estimates of illegal and unreported fish in seafood imports to the USA. *Marine Policy*, 48, 102e113.
- Pucci, M. (2014). Il Ruolo del Veterinario Ufficiale nel riconoscimento delle frodi nel comparto ittico (Thesis of Master Degree). University of Pisa.
- RASFF for safer food — The Rapid Alert System for Food and Feed — 2014 annual report. URL: http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2014.pdf

- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.
- Rubinoff, D. (2006). DNA barcoding evolves into the familiar. *Conservation Biology*, 20(5), 1548-1549.
- Saoudi, M., Abdelmouleh, A., & El Feki, A. (2010). Tetrodotoxin: A potent marine toxin. *Toxin Reviews*, 29(2), 60-70.
- Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H., Aubrey, A. D., ... & Poinar, H. (2009). New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic acids research*, gkp159.
- Siddiqui, T. (2004). *Efficiency of migrant workers' remittances: The Bangladesh case*. University of Dhaka.
- Sorcinelli, P. (1999). *Gli italiani e il cibo: dalla polenta ai cracker*. Pearson Italia Spa.
- Sotelo CG, Pineiro C, Gallardo JM, Perez-Martin RI. 1993. Fish species identification in seafood products. *Trends Food Sci Technol* 4, 395–401
- Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of food science*, 76(9), 157e163.
- Steffens, D. L., Sutter, S. L., & Roemer, S. C. (1993). An alternate universal forward primer for improved automated DNA sequencing of M13. *Biotechniques*, 15, 580e582.
- Steinke, D., Vences, M., Salzburger, W., & Meyer, A. (2005). TaxI: a software tool for DNA barcoding using distance methods. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1975-1980.
- Stieb, E. W., & Sonnedecker, G. (1966). *Drug adulteration: detection and control in nineteenth-century Britain*. University of Wisconsin Press.
- Stiles, M. L., Lahr, H., Lahey, W., Shaftel, E., Bethel, D., Falls, J., et al. (2011). Oceana, bait and switch: How seafood fraud hurts our oceans, our wallets and our health. http://oceana.org/sites/default/files/reports/Bait_and_Switch_report_2011.pdf Accessed 21.11.14.
- Suehiro, M. (1993). [Historical review on chemical and medical studies of globefish toxin before World War II]. *Yakushigaku zasshi. The Journal of Japanese history of pharmacy*, 29(3), 428-434.
- Tao, N. P., Wang, L. Y., Gong, X., & Liu, Y. (2012). Comparison of nutritional composition of farmed pufferfish muscles among *Fugu obscurus*, *Fugu flavidus* and *Fugu rubripes*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28(1), 40e45.

- Tarquini, A. (2010). Le rotte migratorie Bangladesh-Italia. Available at http://www.repubblica.it/solidarieta/cooperazione/2010/11/16/news/le_rotte_migratorie_bangladesh-italia_una_guida_per_una_partenza_consapevole-9186035/ Accessed 21.11.14.
- Teletchea F, Maudet C, Hanni C. 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol* 23 (7), 359–66.
- Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(3), 265e293.
- Terol, J., Mascarell, R., Fernandez-Pedrosa, V., & Perez-Alonso, M. (2002). Statistical validation of the identification of tuna species: bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 963–969.
- Todarello, M. (2013). Prato e le China town Italiane. Lettera 43. Available at http://www.lettera43.it/economia/aziende/prato-e-le-chinatown-italiane_43675114978.htm Accessed 21.11.14.
- Van Schendel, W., 2009, A History of Bangladesh, Cambridge, Cambridge University Press
- Waldinger, R., Tseng, Y., Guillon, M., & Ma Mung, E. (1992). *Divergent diasporas: the Chinese communities of New York and Los Angeles compared.* *Revue européenne des migrations internationales*, 8(3), 91-115.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc B* 360 (1462): 1847-1857.
- Ward, R. D., & Holmes, B. H. (2007). An analysis of nucleotide and amino acid variability in the barcode region of cytochrome c oxidase I (cox1) in fishes. *Molecular Ecology Notes*, 7, 899e907.
- Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of fish biology*, 74(2), 329-356.
- Ward, R. D., Holmes, B. H., & Yearsley, G. K. (2008). DNA barcoding reveals a likely second species of Asian sea bass (barramundi) (*Lates calcarifer*). *Journal of Fish Biology*, 72(2), 458e463.
- Wiemers, M., Fiedler, K. (2007). Does the DNA barcoding gap exist?—a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Front. Zool.* 4, 8 doi:10.1186/1742-9994-4-8.
- Willerslev, E., Cappellini, E., Boomsma, W., Nielsen, R., Hebsgaard, M. B., Brand, T. B., ... & Collins, M. J. (2007). Ancient biomolecules from deep ice cores reveal a forested southern Greenland. *Science*, 317(5834), 111-114.

- Wolf, C., Burgener, M., Hubner, P. and Luthy, J., 2000. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 33, 144–150.
- Wong, E. H. K., & Hanner, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41, 828e837.
- Yasuda, T. and Bowen, R. E. (2006) Chain of custody as an organizing framework in seafood risk reduction. *Marine Pollution Bull* 53: 640 – 649.
- Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution*, 6, 247e251.

Sitografia

- file:///C:/Users/M/Downloads/albisinni_diralim_2014_31_il_pacchetto_igiene.pdf
- <http://apollo11.isto.unibo.it/Tecnicidilaboratorio/Tecniche%20di%20biologia%20molecolare.pdf>
- http://eol.org/content_partners/130
- <http://epochtimes.it/news/i-cibi-da-evitare-in-cina---125713>
- <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=URISERV:f80501>
- <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:it:PDF>
- <http://www.acsi.ch/index.cfm?scheda=191>
- http://www.aduc.it/comunicato/alimenti+cinesi+pericolosi_3811.php
- <http://www.agenziadoganemonopoli.gov.it/wps/wcm/connect/Internet/ed/Dogane/Operatore/Restituzioni+esportazione/Documentazione/Elenco+dei+Paesi+Terzi/>
- http://www.alaskaseafood.org/fishingprocessing/seafoodweb_may11/china.html
- <http://www.alimenti-salute.it/notizie.php?sezionericerca=8&cercacategoria=0>
- <http://www.asianews.it/notizie-it/Gamberetti-alla-colla,-nuovo-scandalo-alimentare-in-Cina-24000.html>
- http://www.guidaconsumatore.com/consumo_consumatori/etichetta-tracciabilita-e-rintracciabilita-dei-prodotti-alimentari.html
- http://www.bio.unipd.it/molbinfo/Corso_Bioinfo_2/lessons/genomica-info.pdf
- http://www.cinacom.com/cina_geografica_02.html
- <http://www.confcommerciopisa.it/limportanza-delletichettatura/>
- <http://www.dhakatribune.com/long-form/2013/dec/25/acts-parliament-2013>
- http://www.europarl.europa.eu/atyourservice/it/displayFtu.html?ftuId=FTU_5.3.9.html
- <http://www.fao.org/news/story/it/item/231593/icode/>
- <http://www.federalimentare.it/Documenti/RicercaNomismaFilieraAgroalimentare.pdf>
- http://www.fondazionemicheletti.it/altronovecento/articolo.aspx?id_articolo=12&tipo_articolo=d_saggi&id=139
- http://www.garlandscience.com/res/pdf/practicalbioinformatics_ch3.pdf
- <http://www.ibol.org/about-us/what-is-dna-barcoding/>
- <http://www.ilfattoalimentare.it/additivi-pesce-imbrogliare-consumatore-non-dichiarati-etichetta-indagine-eurofishmarket.html>

- <http://www.ilfattoalimentare.it/cina-il-latte-alla-melamina-anche-nel-gelato-maxisequestro-svela-lennesima-frode.html>
- <http://www.ilfattoalimentare.it/pesceburro-ruvetto-dissenteria.html>
- <http://www.nove.firenze.it/b102141855-tranci-di-tonno-al-monossido-carbonio-bloccati.htm>
- <http://www.repubblica.it/2009/01/sezioni/esteri/cina-latte-contaminato/cina-latte-contaminato/cina-latte-contaminato.html>
- http://www.rivistapaginauno.it/la_schizofrenia_dell'accoglienza.php
- <http://www.rsc.org/education/eic/issues/2005Mar/Thefightagainstfoodadulteration.asp>
- http://www.salute.gov.it/resources/static/ministero/usmaf/Polizia_Sanitaria_aprile_2010/NAS_Frodi_adulterazione_alterazione_contraffazione_pericolosita_nocivita_USMAF.pdf
- <http://www.salute.gov.it/resources/static/uffici/RelazionePIF2011.pdf>
- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306919211000479>
- <http://www.sicurezzaalimentare.it/sicurezza-alimentare/Pagine/TossinadiShigainformaggifrancesieistaminainfilettidipescecinesidestinatiallenostretavole.aspx>
- <http://www.statoquotidiano.it/05/03/2014/guardia-costiera-manfredonia-sequestro-1-tonn-molluschi-bivalvi/195558/>
- <http://www.stranieriinitalia.it/briguglio/immigrazione-e-asilo/1992/luglio/legge-943-86.html>
- <http://www.thecrookeddope.com/it/cina-duro-lavoro-per-migliorare-qualita-degli-alimenti/>
- http://www.veterinariaalimenti.marche.it/viewdoc.asp?CO_ID=372
- <http://www.vetesc.unimi.it/stuff/rassegna/2/semeraro.pdf>
- http://www.voyagesphotosmanu.com/fiumi_cina.html
- http://www1.adnkronos.com/Archivio/AdnSalute/2007/05/24/Altro/SALUTE-USA-E-PECHINO-INDAGANO-SU-DENTIFRICIO-CINESE-CON-ANTIGELO_132721.php
- http://www9.ulss.tv.it/Minisiti/prevenzione/sical/contenuti/00/content_files/file3/Etichettatura%20evoluzione.pdf
- https://webgate.ec.europa.eu/sanco/traces/output/non_eu_listsPerActivity_it.htm#
- www.biotecnologie.univaq.it/getres.php?resid=529

Riferimenti normativi

- DECISIONE DELLA COMMISSIONE n. 94/360/CE del 20/5/1994 relativa alla riduzione di frequenza dei controlli materiali sulle partite di taluni prodotti importati da Paesi terzi, in forza della direttiva 90/675/CEE del Consiglio.
- DECRETO 27 marzo 2002 del MINISTERO DELLE POLITICHE AGRICOLE E FORESTALI relativo all'etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo
- DECRETO LEGISLATIVO 25 febbraio 2000, n. 80. Attuazione della direttiva 97/78/CE e 97/79/CE in materia di organizzazione dei controlli veterinari sui prodotti provenienti da Paesi terzi.
- DECRETO LEGISLATIVO 3 marzo 1993, n. 123. Attuazione della direttiva 89/397/CEE relativa al controllo ufficiale dei prodotti alimentari.
- DECRETO MINISTERIALE 10 marzo 2004 del Ministro della Salute di concerto con il Ministro dell'Economia e delle Finanze. Misure di salvaguardia nei confronti dei prodotti di origine animale importati da Paesi terzi per il consumo personale.
- DIRETTIVA 91/496/CEE DEL CONSIGLIO, del 15 luglio 1991, che fissa i principi relativi all'organizzazione dei controlli veterinari per gli animali che provengono dai paesi terzi e che sono introdotti nella Comunità e che modifica le direttive 89/662/CEE, 90/425/CEE e 90/675/CEE
- DIRETTIVA 97/78/CE DEL CONSIGLIO, del 18 dicembre 1997, che fissa i principi relativi all'organizzazione dei controlli veterinari per i prodotti che provengono dai paesi terzi e che sono introdotti nella Comunità e che abroga la direttiva 90/675/CEE
- LEGGE 28 febbraio 1990, n. 39. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 30 dicembre 1989, n. 416, recante norme urgenti in materia di asilo politico, di ingresso e soggiorno dei cittadini extracomunitari e di regolarizzazione dei cittadini extracomunitari ed apolidi già presenti nel territorio dello Stato. Disposizioni in materia di asilo.
- LEGGE 30 dicembre 1986, n. 943. Norme in materia di collocamento e di trattamento dei lavoratori extracomunitari immigrati e contro le immigrazioni clandestine
- REGOLAMENTO (CE) n. 1069/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 21 ottobre 2009 recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di

origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 (regolamento sui sottoprodotti di origine animale).

- **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
- **REGOLAMENTO (CE) N. 206/2009 DELLA COMMISSIONE** del 5 marzo 2009 relativo all'introduzione nella Comunità di scorte personali di prodotti di origine animale e che modifica il regolamento (CE) n. 136/2004
- **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
- **REGOLAMENTO (CE) N. 2074/2005 DELLA COMMISSIONE** del 5 dicembre 2005 recante modalità di attuazione relative a taluni 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
- **REGOLAMENTO (CE) N. 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO** del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari.
- **REGOLAMENTO (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO** del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
- **REGOLAMENTO (CE) N. 854/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO** del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.
- **REGOLAMENTO (CE) N. 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO** del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.

- **REGOLAMENTO (CE) n. 1774/2002 del PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO**, del 3 ottobre 2002, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano.
- **REGOLAMENTO (CE) n. 178/2002, DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO** del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare
- **REGOLAMENTO (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 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione
- **REGOLAMENTO (UE) N. 142/2011 DELLA COMMISSIONE** del 25 febbraio 2011 recante disposizioni di applicazione del regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano, e della direttiva 97/78/CE del Consiglio per quanto riguarda taluni campioni e articoli non sottoposti a controlli veterinari alla frontiera
- **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, recante modifica ai regolamenti (CE) n. 1184/2006 e (CE) n. 1224/2009 del Consiglio e che abroga il regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio
- **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

Appendice