



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



## ***DIREZIONE OPERATIVA PRODUZIONI ZOOTECHNICHE***

# **L'ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA: RICADUTA APPLICATIVA NELLE REALTÀ TERRITORIALI**

Roma, 7 maggio 2014

**Identificazione di specie nel settore ittico: messa a punto di tecniche di laboratorio e comparazione nell'utilizzo diagnostico**

**Dr.ssa Roberta Cavallina**

**Dr.ssa Maria Concetta Campagna**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



## Sostituzione di una specie ittica con un'altra specie

Danno di natura economico-commerciale

- sostituzione con specie di minor pregio

Danno di natura protezionistica

- trasformazione e consumo di animali marini protetti

Danno di natura religiosa

- nel kasher ebraico l'esclusione dall'alimentazione degli ebrei osservanti di consumo di pesci senza pinne e squame





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



## Danno di carattere sanitario

- sostituzione di code di rospo (rana pescatrice) con tranci di pesce palla (avvelenamento da tetrodotossina)
- sostituzione di bivalvi sgusciati precotti nostrani con bivalvi esotici (presenza di biotossine termoresistenti);
- sostituzione di filetti di pesce persico nostrano (*Perca fluviatilis*), oppure di cernia, con il persico del Nilo (*Lates niloticus*) (problemi igienico-sanitari);
- possibilità di commercializzazione di preparazioni alimentari contenenti pesce, crostacei o molluschi non dichiarati (problemi allergici)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Comunità Europea

Settore prodotti della pesca e dell'acquacoltura

Reg. (CE) n°2065/2001, applicativo del Reg. (CE) n°104/2000

art.9: sistema di controllo relativo alla tracciabilità

dell'informazione sui prodotti della pesca e dell'acquacoltura

D.M. 27/03/02 % Etichettatura dei prodotti ittici e sistema di controllo+e successive modifiche: elenco delle denominazioni in lingua italiana delle specie ittiche di interesse commerciale





L'identificazione di alcune specie è spesso resa difficile

dalla presenza, nei nostri mercati, di specie ittiche provenienti ormai da ogni parte del mondo

dalla presenza sul mercato, per venire incontro alle esigenze del consumatore, di prodotti ittici pronti da cucinare sottoforma di filetti, bocconcini, tranci

Difficoltà, non solo da parte del Consumatore ma anche da parte degli Organi di Controllo e di Consulenti che si occupano di certificazione di filiera e qualità dei prodotti alimentari





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Abbiamo quindi ritenuto necessario,  
per i motivi che abbiamo illustrato,  
sviluppare un sistema di  
identificazione di specie, nel settore  
ittico, da poter utilizzare come supporto  
tecnico-analitico in fase di controllo  
ufficiale e in fase di qualifica fornitori.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Le tecniche di laboratorio più affidabili  
per il riconoscimento di specie ittiche  
sono:

Isoelettrofocalizzazione (IEF) uno dei  
metodi ufficiali adottato dalla Food and  
Drug Administration degli Stati Uniti  
d'America (AOAC Official Method of  
analysis 1995 . 980.160)

Tecniche di biologia molecolare



Gli obiettivi del progetto sono stati:

- Mettere a punto e validare un metodo interno, quale l'isoelettrofocalizzazione (IEF), per l'identificazione delle specie ittiche.
- Effettuare uno studio comparativo sull'identificazione di specie utilizzando due tecniche elettroforetiche a confronto l'IEF e l'elettroforesi capillare zonale (CZE).
- Impostare una banca dati con tracciati elettroforetici standard creando per le specie oggetto dello studio una vera e propria mappa proteica specie-specifica.

.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



## ISOELETTROFOCALIZZAZIONE

Metodo che permette di separare le proteine sarcoplasmatiche idrosolubili, in funzione del loro punto isoelettrico (pI), pH al quale la carica complessiva della proteina è nulla.







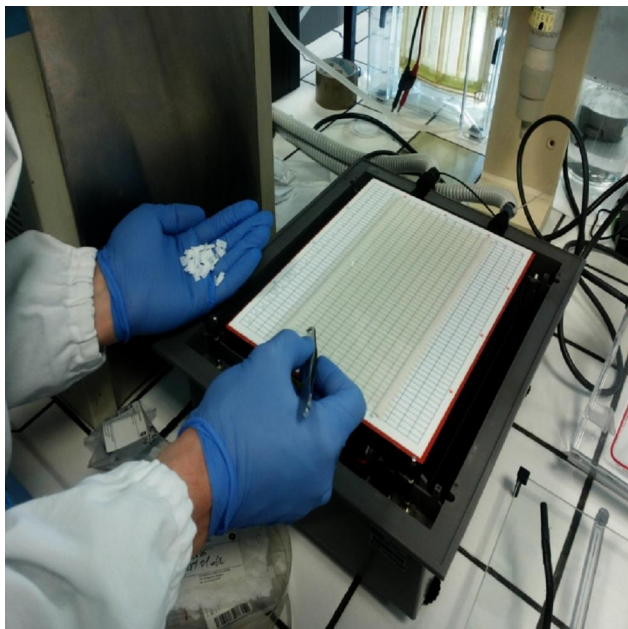
Le proteine sarcoplasmatiche sono estratte come descritto nell'Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL n° 980.16 (1990) e la loro concentrazione è determinata secondo metodo di Lowry.





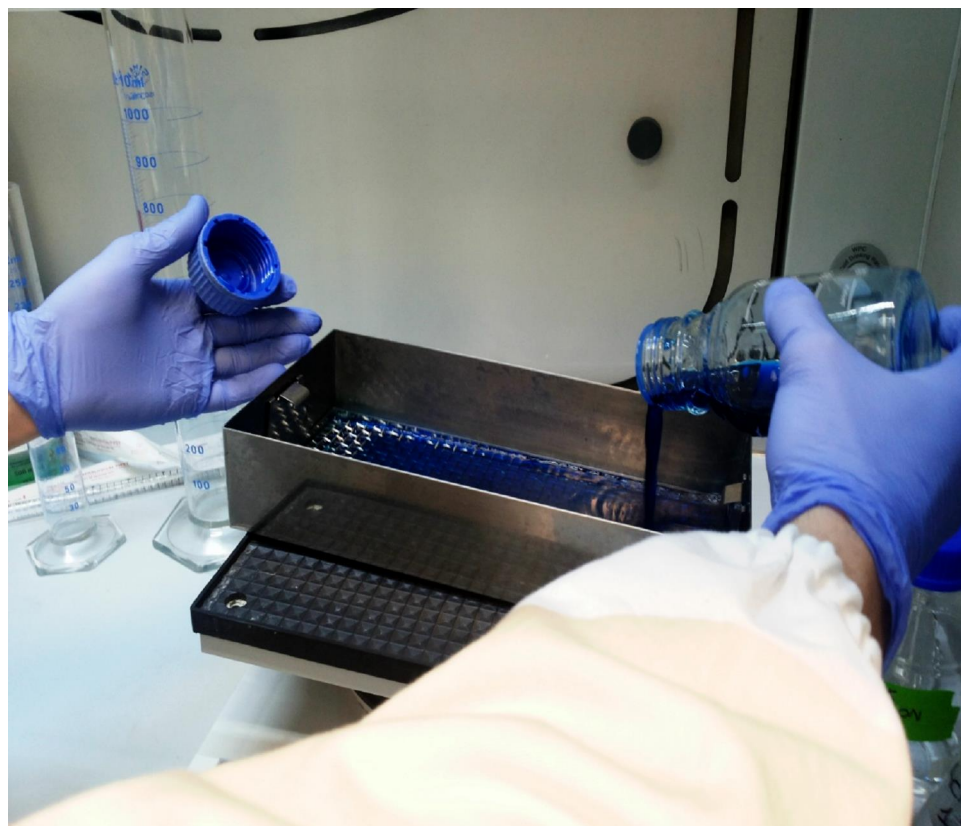


Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



L'estratto è poi seminato su un gel di poliacrilammide a cui viene applicato un campo elettrico. Le molecole migrano verso il loro punto isoelettrico dove si bloccano per annullamento della loro carica.



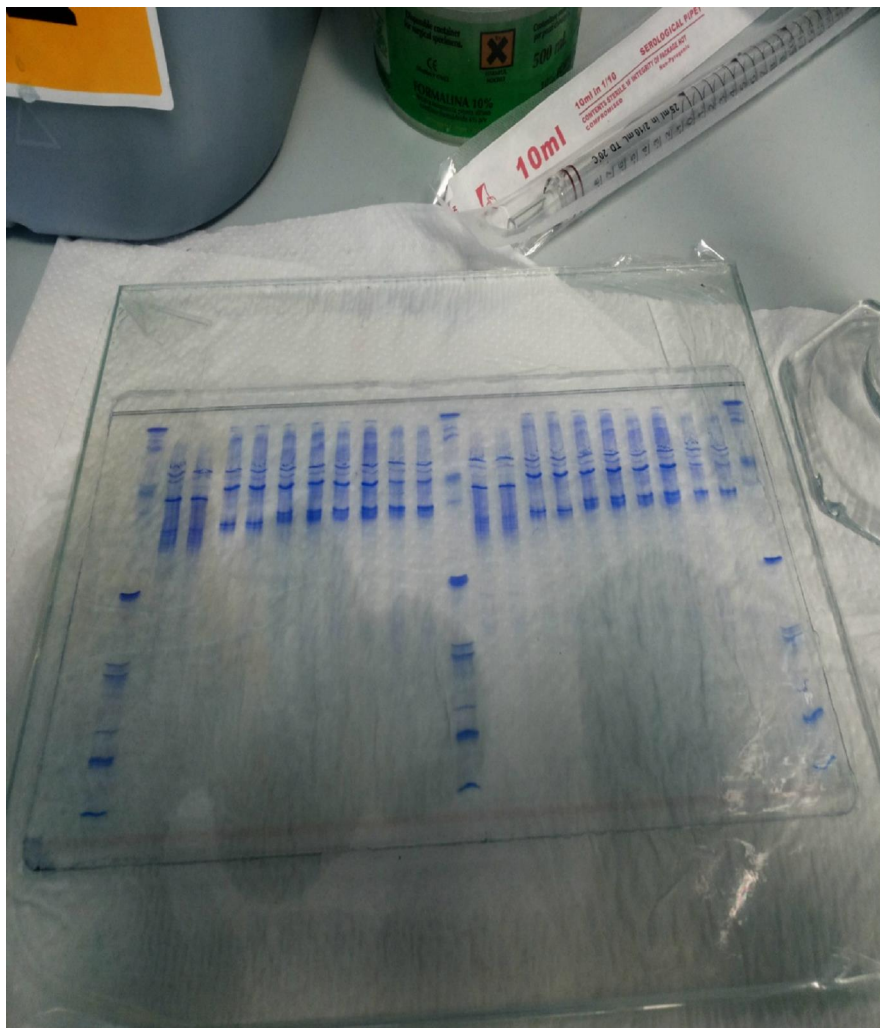


Al termine della corsa il gel  
subisce una fase di fissaggio,  
colorazione e decolorazione.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



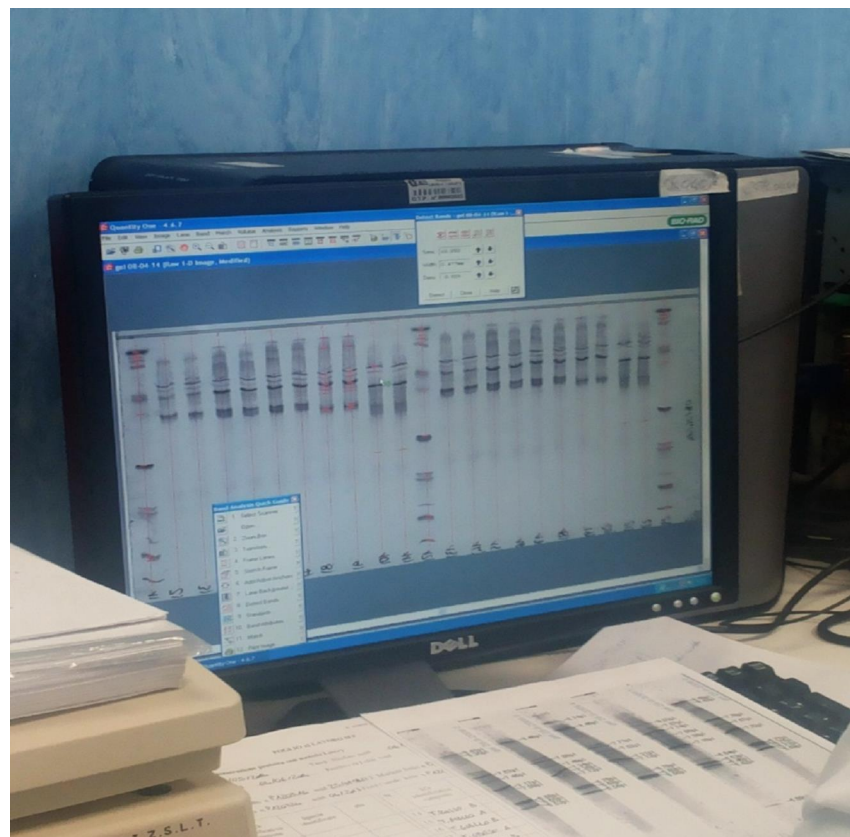
Segue conservazione ed  
essiccazione del gel







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Ed infine acquisizione ed  
elaborazione del gel



Le proteine estratte da diverse specie ittiche, essendo la diretta espressione del codice genetico, hanno pl differenti e danno origine a tracciati elettroforetici caratteristici ed identificativi di ogni specie.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



## ELETTROFORESI CAPILLARE ZONALE

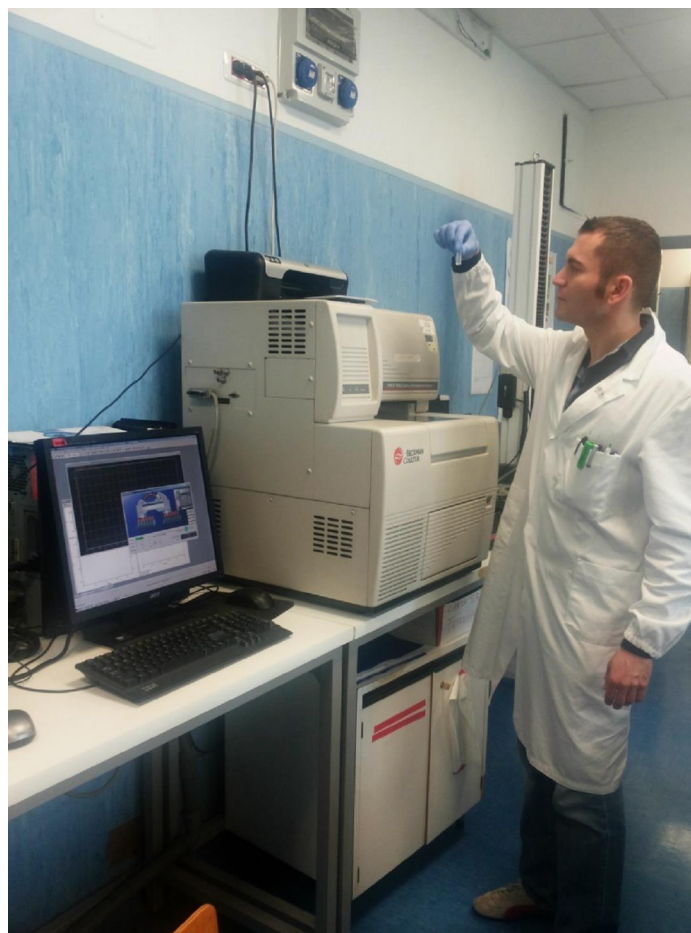
Tecnica elettroforetica nella quale la separazione avviene all'interno di un tubo capillare ed i componenti di una miscela sono trasportati attraverso un capillare orizzontale da una forte differenza di potenziale che genera un flusso di corrente continua lungo l'intera lunghezza del tubo.



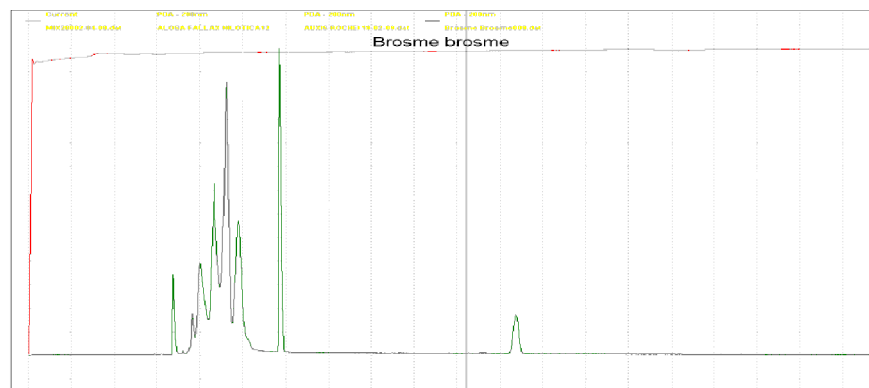




Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Protocollo esecutivo:  
pesata del campione  
estrazione delle proteine  
determinazione proteica (Lowry)  
iniezione del campione per la  
separazione elettroforetica su  
colonna capillare.



Sono stati analizzati 173 esemplari di specie ittiche diverse mediante isoelettrofocalizzazione e di questi esemplari 43 sono stati esaminati anche mediante elettroforesi capillare zonale. Le fasi che hanno portato all'identificazione specie specifica di ogni esemplare e alla creazione della banca dati dei tracciati standard sono le seguenti:

Foto del soggetto

Classificazione in base alle caratteristiche morfologiche da parte di Veterinari Ispettori

Prelievo di tessuto muscolare

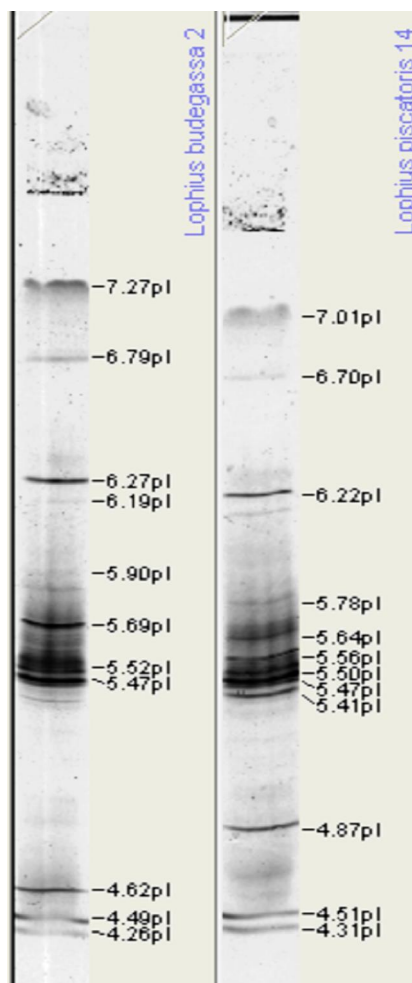
Estrazione del campione

Corsa elettroforetica

Elaborazione del tracciato

Creazione banca dati

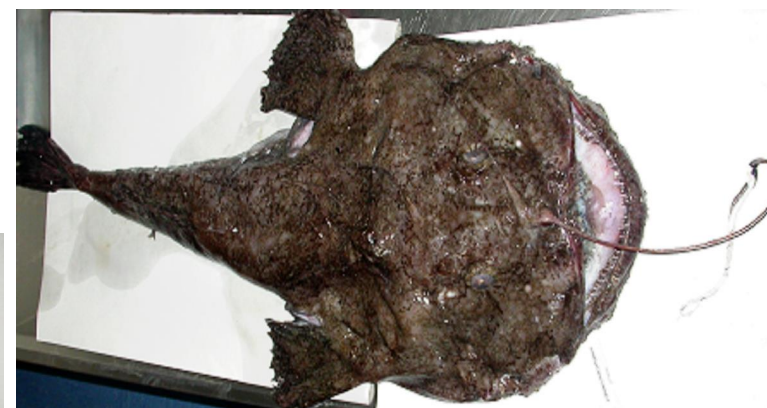




| Specie Ittica: Lophius Budegassa                                | Specie Ittica: Lophius Piscatorius                             |
|---|--|
| N° bande 11   | N° bande 12  |
| pI:7.27, 6.79, 6.27, 6.19, 5.90, 5.69, 5.52,5.47,4.62,4.49,4.26 | pI:7.01,6.70,6.22,5.78,6.64,5.58,5.50,5.47,5.41,4.87,4.51,4.31 |



Lophius Budegassa



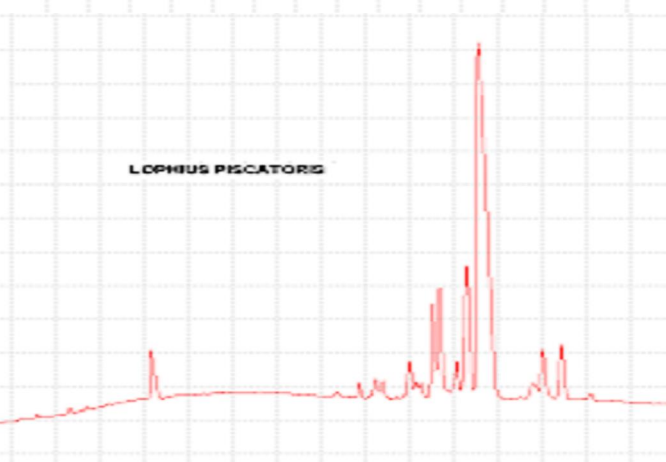
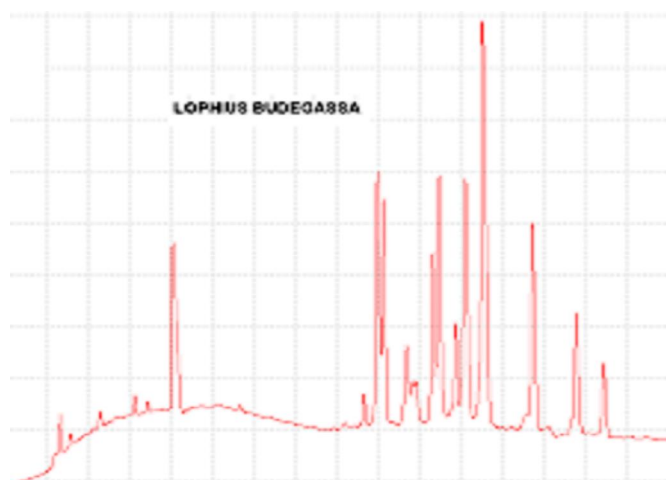
Lophius Piscatorius







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



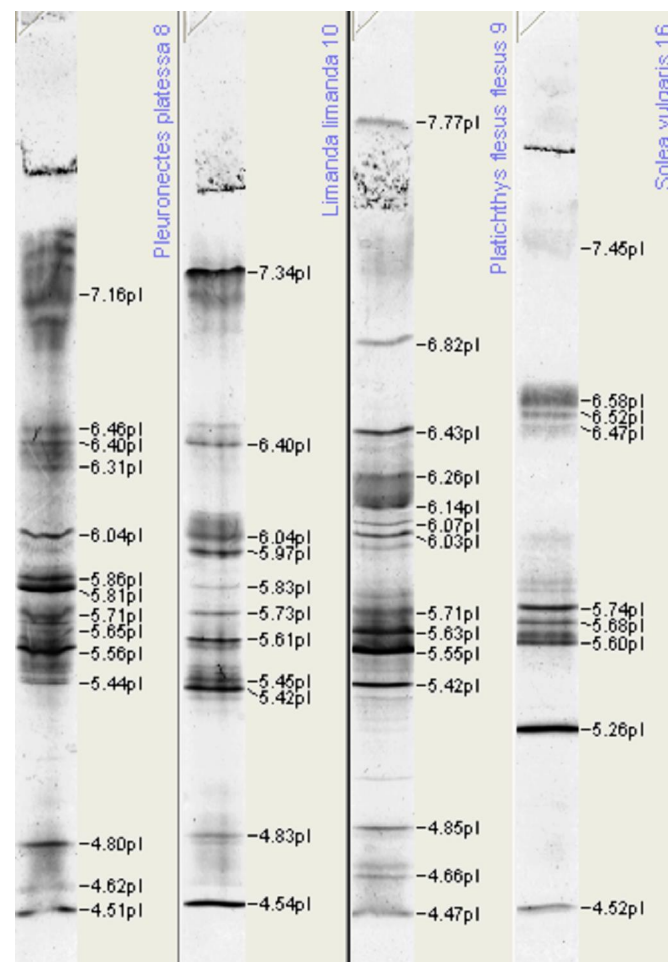
## PESCI PIATTI

**Pleuronectes platessa (Platessa)**

**Solea vulgaris (Sogliola)**

**Platichthys flesus flesus (Passera)**

**Limanda limanda (Limanda)**

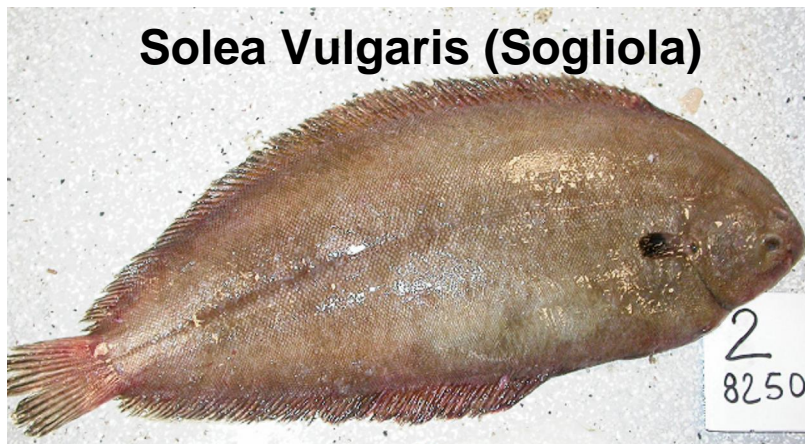


| Specie Ittica:<br>Pleuronectes platessa  | Specie Ittica:<br>Limanda limanda                                      | Specie Ittica:<br>Platichthys flesus flesus                                      | Specie Ittica:<br>Solea vulgaris                    |
|--|--|--|---|
| N° bande 14  | N° bande 11  | N° bande 14  | N° bande 9  |
| pI:7.16,6.46,6.40,6.31,6.04,5.86,<br>5.81,5.71, 5.65, 5.56, 5.44,4.80,<br>4.62,4.51. | pI:7.34,6.40,6.04,5.97,<br>5.83, 5.73, 5.61, 5.45,<br>5.42, 4.83, 4.54 | pI:7.77,6.82,6.43,6.26,<br>6.14,6.07,6.03,5.71,5.63,<br>5.55,5.42,4.85,4.66,4.47 | pI:7.45,6.58,6.52,6.47,5.<br>74,5.68,5.60,5.26,4.52 |





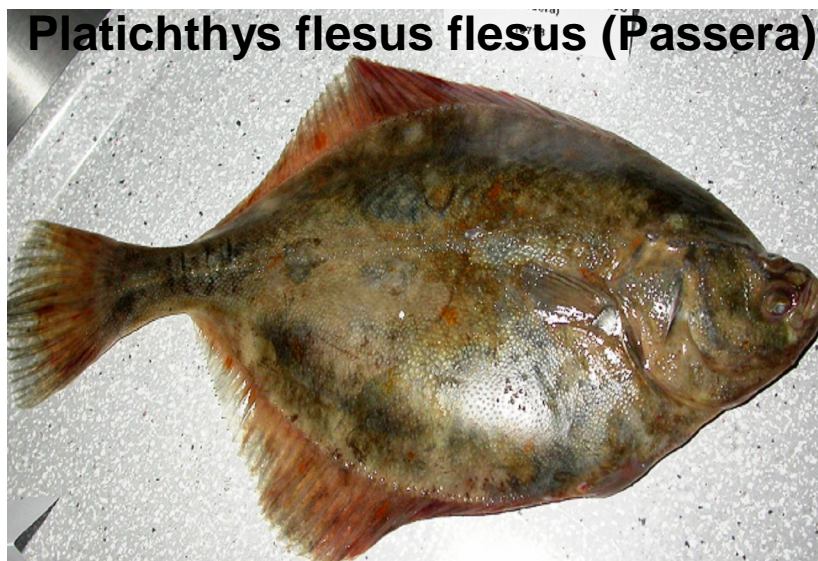
**Solea Vulgaris (Sogliola)**



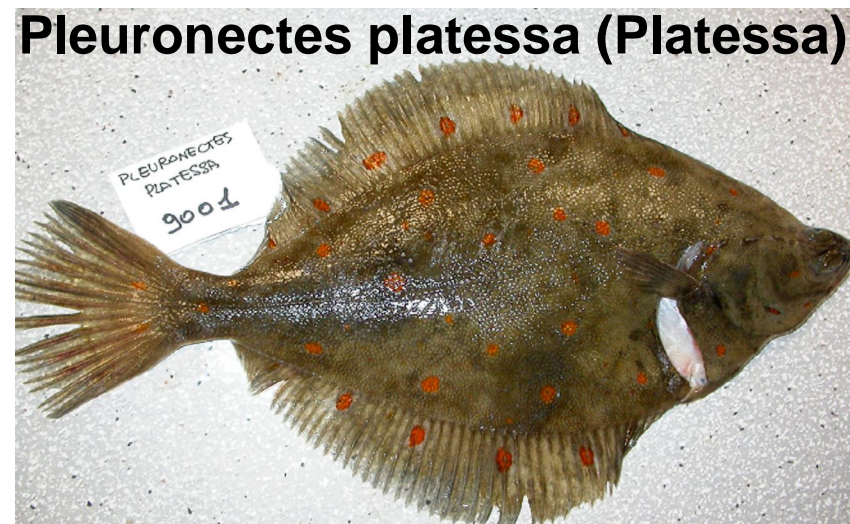
**Limanda limanda (Limanda)**



**Platichthys flesus flesus (Passera)**



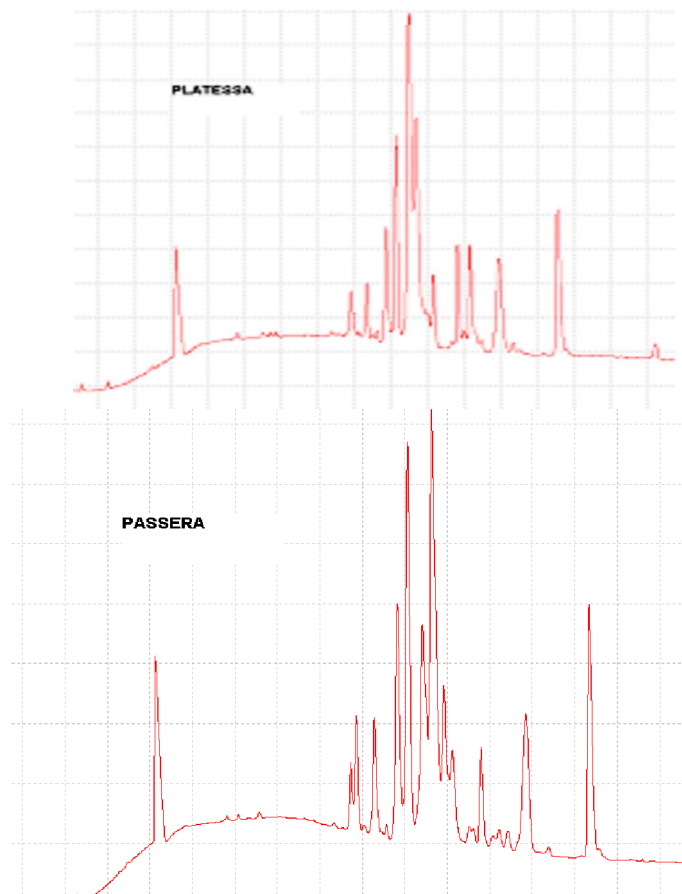
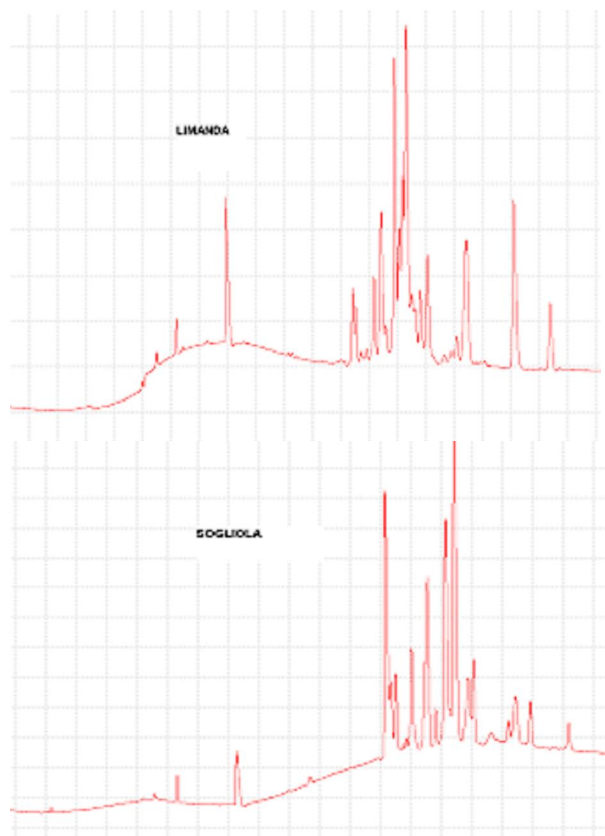
**Pleuronectes platessa (Platessa)**

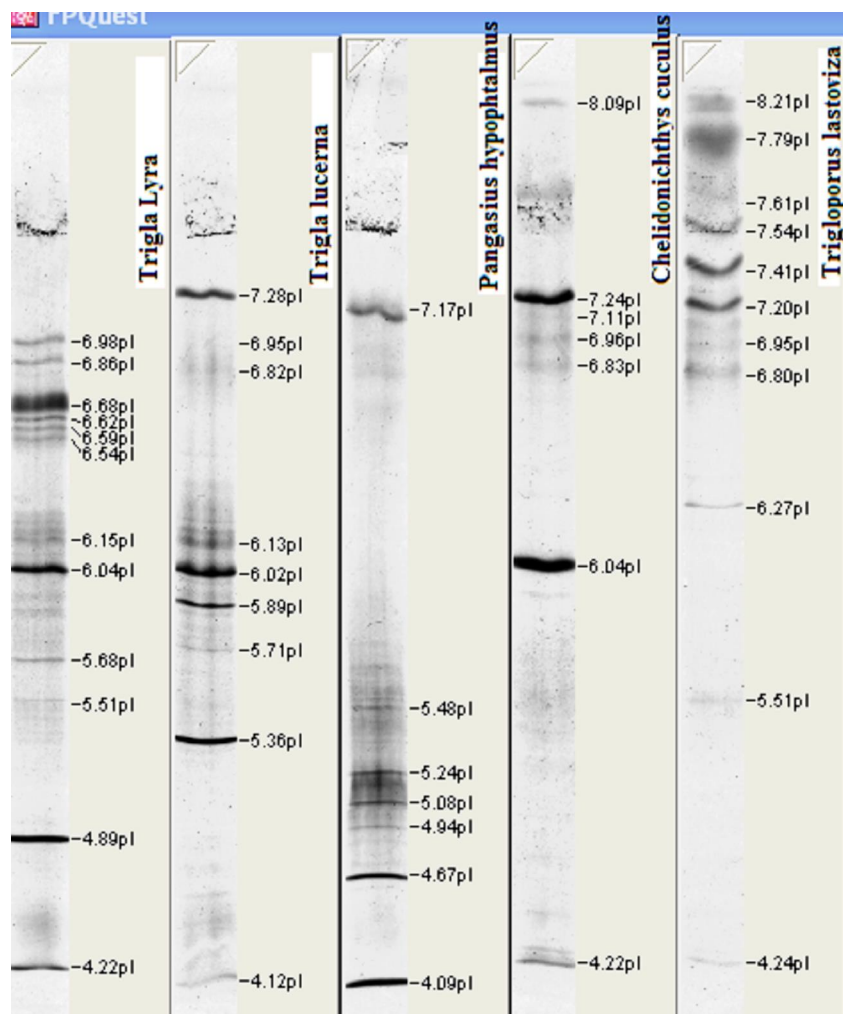






Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana





Gallinella o Pangasio?



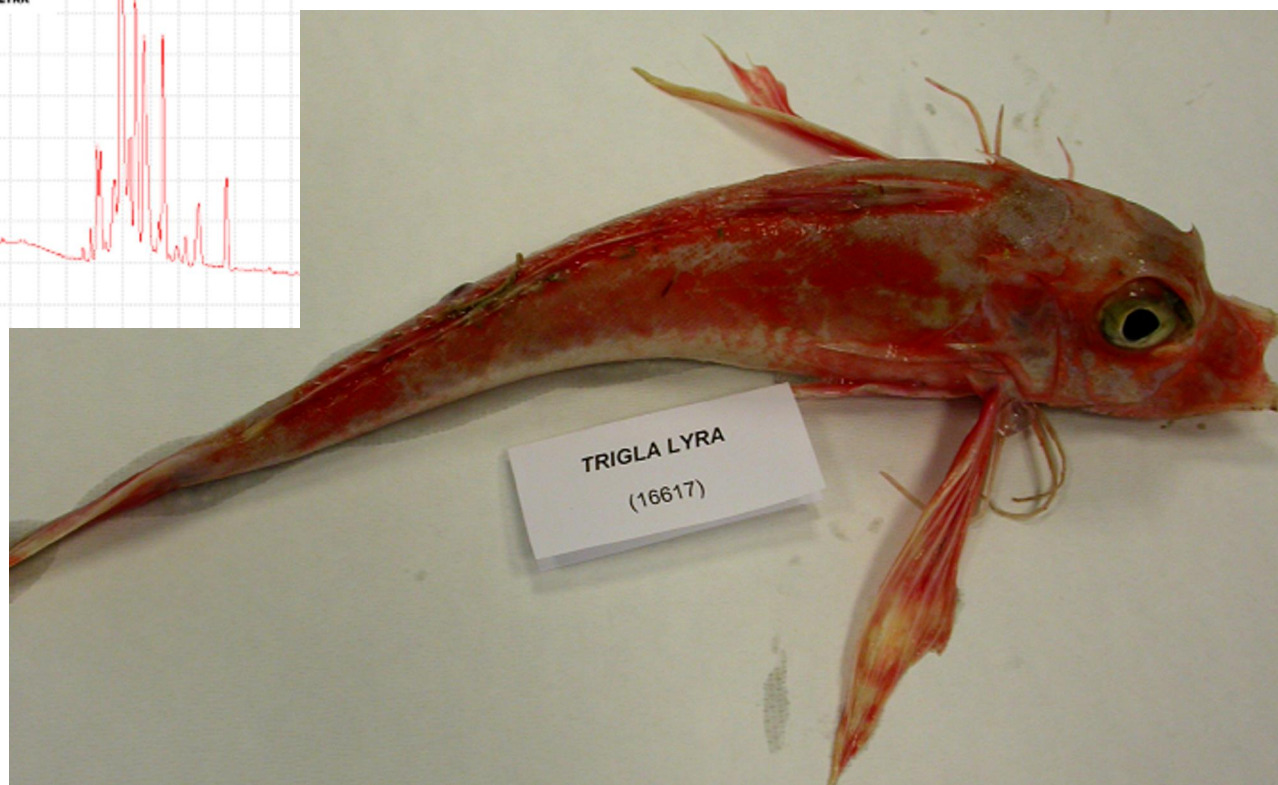
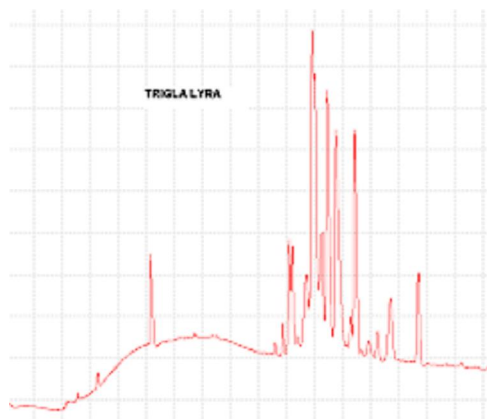


| Trigla lyra  | Trigla lucerna                                  | Pangasius hypopthalmus                | Chelidonichthys cuculus               | Trigloporus lastovizia                                    |
|--|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| N° bande 12  | N° bande 9                                      | N° bande 7                            | N° bande 7                            | N° bande 11   |
| pI:6.98,6.86,6.68,6.62,6.59,6.54,6.15,6.04,5.68,5.51,4.89,4.22 | pI:7.28,6.95,6.82,6.13,6.02,5.89,5.71,5.36,4.12 | pI:7.17,5.48,5.24,5.08,4.94,4.67,4.09 | pI:8.09,7.24,7.11,6.96,6.83,6.04,4.22 | pI:8.21,7.79,7.61,7.54,7.41,7.20,6.95,6.80,6.27,5.51,4.24 |





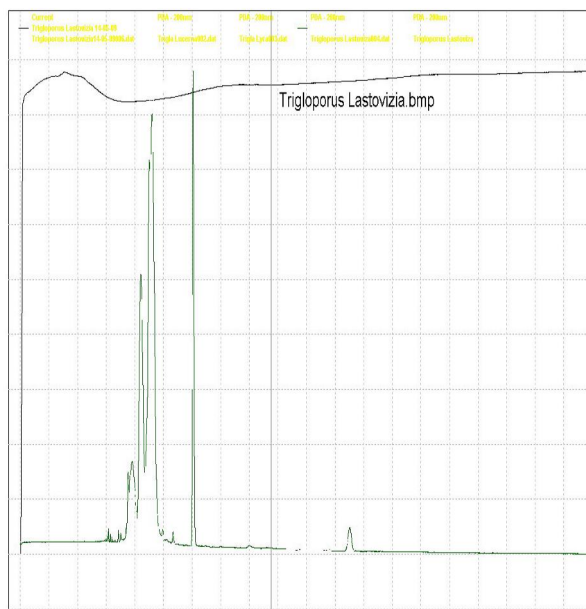
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana

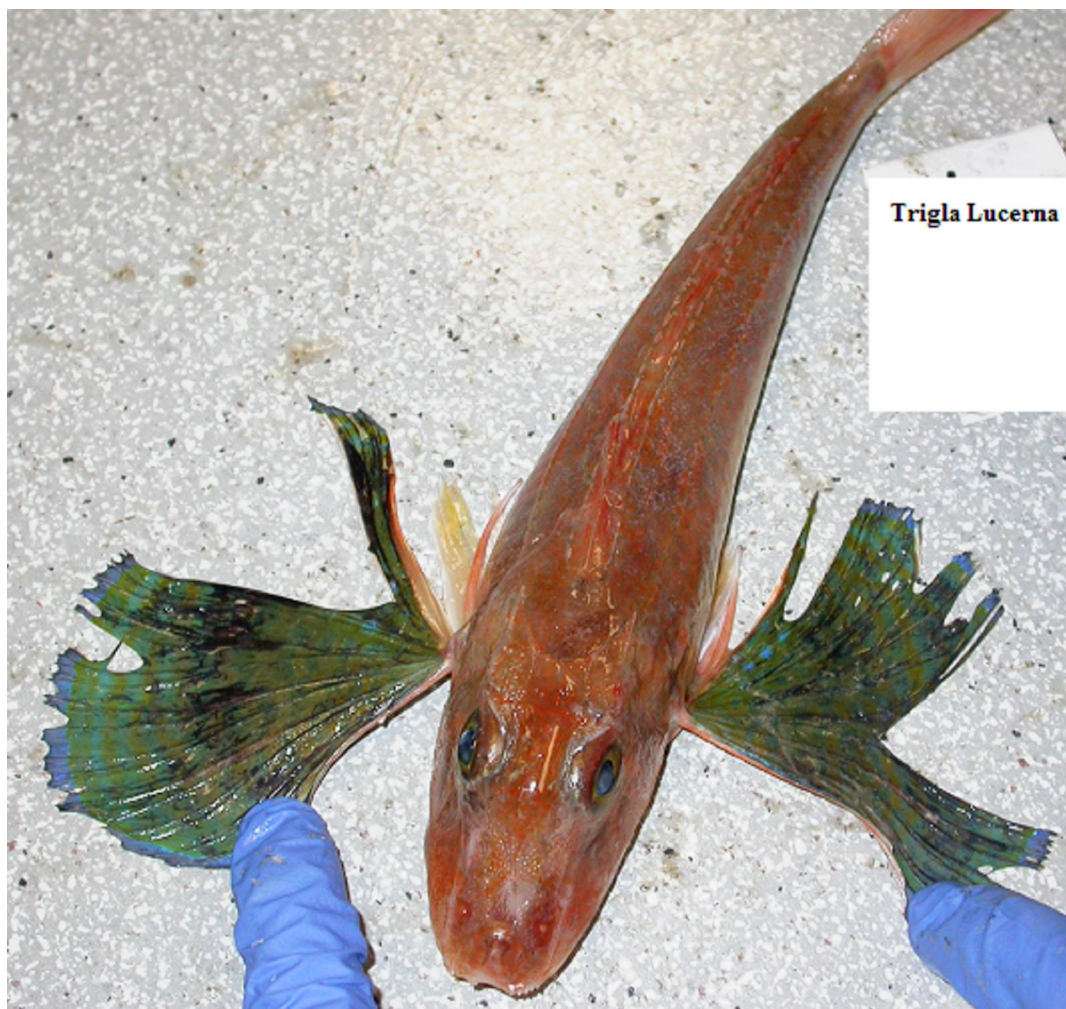
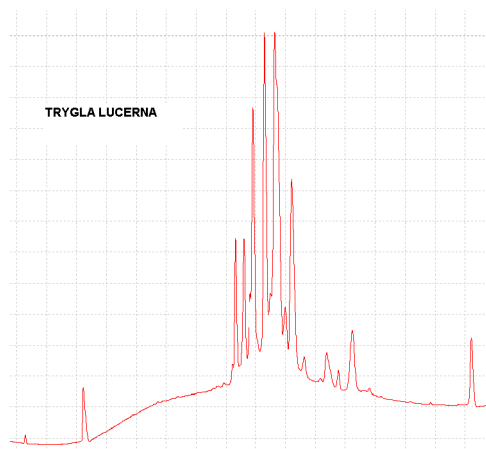


Trigloporus lastoviza





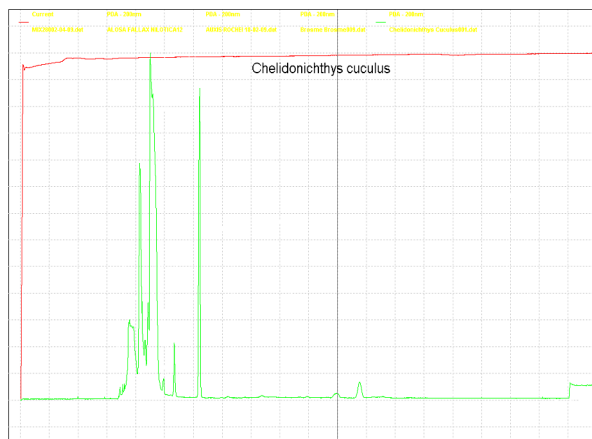
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



**GALLINELLA o CAPPONE**  
*Chelidonichthys cuculus*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Con la realizzazione di questo progetto è stato appurato che è possibile individuare esemplari appartenenti a specie diverse in quanto presentano profili elettroforetici diversi sia per numerosità di picchi e per modalità di distribuzione in base al loro tempo di ritenzione (CZE) e sia per n° di bande significative e per range di distribuzione di quest'ultime nel gradiente di pH per IqEF

Ciò ci ha permesso di costruire una mappa proteica caratteristica per ogni esemplare analizzato appartenente ad una specifica specie ittica.





## ISOELETTROFOCALIZZAZIONE ed ELETTROFORESI CAPILLARE ZONALE

### vantaggi e svantaggi dei due metodi

#### IEF

##### *vantaggi:*

Semplicità di esecuzione

Elevata riproducibilità

##### *svantaggi:*

Non eseguibile su prodotti trasformati

#### CZE

##### *vantaggi:*

Automatizzazione e tempi di  
analisi ridotti

Basso consumo di reagenti  
(impatto ambientale)

##### *svantaggi:*

Non eseguibile su prodotti trasformati

Costi di gestione elevati



Tesi di Laurea presso l'Università degli Studi di Roma di Torvergata - Facoltà di Medicina e Chirurgia

- 1) IDENTIFICAZIONE DI SPECIE NEL SETTORE ITTICO MEDIANTE ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)
- 2) DUE TECNICHE DIAGNOSTICHE A CONFRONTO PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ITTICHE: IEF E CZE

#### Pubblicazioni e comunicazioni

"Identificazione di specie nel settore ittico-Scienza dell'Alimentazione. vol.1, pag.29-35- 2008 Campagna, Tepidino, Di Domenico, Saccares, Cavallina

"L'identificazione di specie ittiche: isoelettrofocalizzazione (IEF) ed elettroforesi capillare (CZE), tecniche diagnostiche a confronto. Atti XI Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. - Parma, 30 settembre-2 ottobre 2009, p.106-107 Campagna, Bucci, Bottalico, Nardoni, Muratore, Cavallina

"Nuove frodi alimentari nel settore ittico: Gallinella o Pangasio?

XXI Convegno AIVI (Associazione Italiana Veterinari Igienisti) 8-9-10 giugno 2011, Firenze. Campagna, Marozzi., Condoleo, Bottalico Nardoni, Cavallina.





POS CCR 081 INT %Identificazione di specie ittiche (isoelettrofocalizzazione)÷

Merluccius Merluccius (nasello o merluzzo)

Pollachius Virens (merluzzo carbonara)

Pleuronectes Platessa (platessa)

Limanda Limanda (limanda)

Trigla Lucerna (gallinella o cappone)

Lophius Piscatorius (rospo o rana pescatrice)

Lepidorhombus Whiffiagonis (rombo giallo)

Helicolenus Dactylopterus (scorfano di fondale)

Cepola Macrophtalma (cepola)

Merlangius Merlangus (merlano o molo)

Gadus Morhua (merluzzo nordico)

Solea Vulgaris (sogliola)

Platichthys Flesus Flesus (passera)

Glyptocephalus Cynoglossus (passera atlantica)

Trygla Lyra (gallinella o cappone)

Lophius Budegassa (rospo o rana pescatrice)

Pollachius Pollachius (pollack)

Phycis Blennoides (musdea o mustella)

Melanogrammus aeglefinus (eglefino)



Per ogni specie sopra riportata sono stati presi in esame cinque soggetti.

Ognuno di questi soggetti è stato come al solito

Fotografato

Classificato in base alle caratteristiche morfologiche

Sono stati effettuati due prelievi di tessuto muscolare

Per ogni soggetto i due campioni estratti sono stati sottoposti a doppia corsa elettroforetica

Per ogni specie sono stati elaborati e confrontati i 20 tracciati eseguiti e inseriti nella banca dati

Partecipazione annuale a ring test internazionale



Possiamo concludere che l<sub>1</sub>EF è un metodo analitico di facile utilizzo, economico ma soprattutto discriminante fra le specie ittiche; può essere utilizzato per identificare le sostituzioni di specie in quanto il tracciato elettroforetico che si ottiene è specie-specifico e quindi caratteristico solamente di una determinata specie ittica. L'elettroforesi capillare zonale è anche essa specie specifica ma risulta essere una tecnica più elaborata dell<sub>1</sub>EF

Si può affermare quindi che tale metodo può essere un mezzo di supporto per gli Organi di Controllo in fase di Ispezione e può essere utilizzato nel processo di certificazione dei fornitori nell'ambito della Grande Distribuzione Organizzata (GDO).



Si ringrazia

il Mercato Ittico di Guidonia

ed in particolare

il Dr. Giuseppe Muratore ASL RM G







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



GRAZIE  
PER  
L' ASCOLTO

