

IDENTIFICAZIONE DI SPECIE ZOOLOGICA NEGLI ALIMENTI



Dott.ssa Bianca Maria Varcasia
Direz. Operativa Controllo degli Alimenti
Firenze, 14 Dicembre 2011

POS MIC 014 INT

«IDENTIFICAZIONE DI SPECIE: AVICOLA, BOVINA,
CAPRINA, OVINA, SUINA»

➡ METODO RAPIDO

METODO: MICROARRAY ➡ PROCESSARE PIU' CAMPIONI
CONTEMPORANEAMENTE

➡ PIU' ANALISI CONTEMPORANEAMENTE

MATERIALI: GeneTop Meat Kit



PERCHE' L' IDENTIFICAZIONE DI SPECIE?



FRODI ALIMENTARI

produzione e commercio di alimenti non conformi a "quanto dichiarato"



CLASSIFICAZIONE

- ✓ PER CARATTERI OGGETTIVI
- ✓ PER CATEGORIA GIURIDICA

Da qui l'esigenza da parte dei Servizi Veterinari, nel corso di controlli ufficiali, di richiedere l'identificazione di specie zoologica per il controllo di quanto dichiarato in etichetta

FRODI ALIMENTARI

ADULTERAZIONE



Operazioni che alterano la struttura originale di un alimento mediante sostituzione di elementi propri dell'alimento con altri estranei, ovvero con la sottrazione o aumento delle quantità proporzionali di uno o più dei suoi componenti, lasciando loro l'apparenza originaria. Possono avere riflessi anche igienico-nutrizionali e, in alcuni casi, di GRAVE pericolo per la salute pubblica. (cfr. artt. 440, 442 e 444 c.p.)

ES. utilizzo di sbiancanti

ALTERAZIONE



Modificazione della composizione originaria di una sostanza a causa di fenomeni degenerativi spontanei, determinati da errate modalità o eccessivo prolungamento dei tempi di conservazione.



SOFISTICAZIONE



Consiste nell'aggiungere all'alimento sostanze estranee che ne alterano l'essenza, corrompendo o viziando la composizione naturale e simulandone la genuinità con lo scopo di migliorarne l'aspetto o di coprirne difetti.

ES. vino al metanolo



CONTRAFFAZIONE



Formare ex novo un alimento con l'apparenza della genuinità in quanto prodotto con sostanze diverse, per qualità o quantità, da quelle che normalmente concorrono a formarlo. Si tratta di una vera e propria falsificazione in quanto consiste nel dare fraudolentemente l'apparenza di genuinità ad una sostanza che si distingue da quella imitata per caratteristiche qualitative e quantitative (cfr. artt. 440, 441, 442 e 444 c.p.)

ES. olio di semi per olio di oliva

FRODI ALIMENTARI

SANITARIE

LEDONO LA SALUTE

- ✓ Art. 439 C.P. "avvelenamento di acque e sostanze alimentari"
- ✓ Art. 440 C.P. "adulterazione o contraffazione di sostanze alimentari"
- ✓ Art. 442 C.P. "commercio di sostanze alimentari contraffatte o adulterate"
- ✓ Art. 444 C.P. "commercio di sostanze alimentari nocive"
- ✓ Art. 5 Legge 30.04.62 n. 283 "disciplina igienica della produzione e vendita delle sostanze alimentari e delle bevande"
- ✓ Reg. CE 852/2004 "igiene dei prodotti alimentari"

COMMERCIALI

LEDONO SOLO I DIRITTI CONTRATTUALI E PATRIMONIALI

- ✓ Art. 514 C.P. "frodi contro le industrie nazionali"
- ✓ Art. 515 C.P. "frodi nell'esercizio del commercio"
- ✓ Art. 516 C.P. "vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine"
- ✓ Art. 517 C.P. "vendita di prodotti industriali con segni mendaci"
- ✓ Art. 517 bis C.P. "circostanza aggravante", "nel caso in cui il reato di cui all'art. 517 abbia come oggetto alimenti o bevande la cui denominazione d'origine o le cui caratteristiche sono protette dalle norme vigenti"

MICROARRAY

MICROSCOPIC GLASS ARRAY



disposizione ordinata, o schieramento, su un vetrino da microscopio, di elementi, o sonde, che consentono il legame specifico di geni o prodotti genici

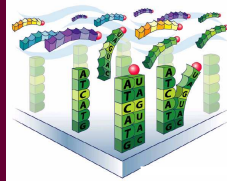
DEFINIZIONE



Un Microarray è definito come un supporto solido sul quale sono immobilizzati, in posizioni ben definite, migliaia di sequenze di geni differenti per poter studiare contemporaneamente assetti genetici o patterns di espressione (nel tempo, durante lo sviluppo e in differenti condizioni ambientali)

MICROARRAY: PRINCIPIO

Ibridazione tra sequenze di acidi nucleici marcate e sequenze specifiche (sonde) immobilizzate su un supporto adeguato



Specificità e affinità di riconoscimento fra sequenze complementari

MICROARRAY: COME SONO FATTI?

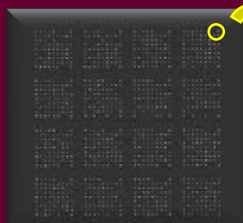
SUPPORTO

Sottile supporto di vetro
Chip a silicio
Membrana di Nylon

SEQUENZE

DNA
cDNA
Oligonucleotidi (5-50 bp)

Le singole sonde sono legate al supporto su piccole aree circolari disposte secondo un preciso ordine geometrico lungo linee orizzontali (righe) e linee verticali (colonne), in modo del tutto analogo a quello dei numeri di una matrice



Ogni elemento della matrice, corrispondente a una singola specie molecolare di identità nota

TIPOLOGIE DI ALIMENTI

«...alimenti di origine animale crudi o cotti nei quali le specie zoologiche rilevate con il presente metodo sono presenti anche in combinazione tra loro o con alimenti non di origine animale. La presente procedura non si applica ai baby food» (POS MIC 014 INT)

PRODOTTI A BASE
DI CARNE

(KEBAB)



PRODOTTI A BASE
DI LATTE

(LATTE-MOZZARELLA
DI BUFALA)



IDENTIFICAZIONE SPECIE ZOOLOGICA IN ALIMENTI CON " MICROARRAY "



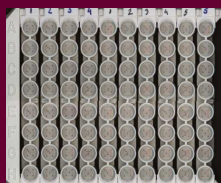
- ✓ BOVINO
- ✓ BUFALO
- ✓ CAVALLO
- ✓ OVINO
- ✓ SUINO



- ✓ CAPRA
- ✓ AVICOLO
- ✓ POLLO
- ✓ TACCHINO
- ✓ PESCE

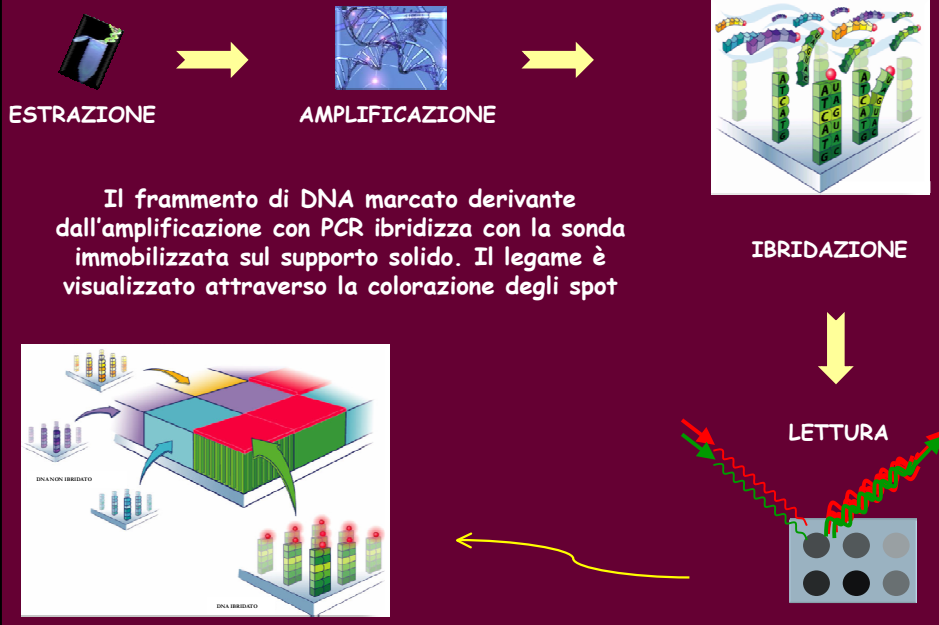


NEL PROSSIMO FUTURO: cane, gatto, ratto, topo, coniglio...



NEGATIVO	SUINO POSITIVO	OVINO POSITIVO	BOVINO POSITIVO
CAPRINO POSITIVO	PESCE POSITIVO	AVICOLO POSITIVO	

MICROARRAY: COME SI FA L'ANALISI?



COME SI FA L'ESTRAZIONE ?

PARTIAMO DAL CAMPIONE



Prelevare circa 200 mg



- Aggiungere la Proteinasi K e il Buffer di estrazione
- Incubare a 56° per 90 min /overnight
- Incubare a 50°C per 30 min
- Prelevare circa 400 µl di campione e trasferirlo nella provetta "SAMPLE TUBE"



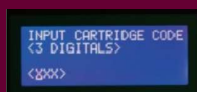
Accendiamo lo strumento: un segnale acustico e la comparsa della scritta "Stand-by" sul display indicano che lo strumento è pronto.



Avviare la calibrazione ed il riposizionamento dell'asse premendo "Start"



Inserire il "codice relativo al kit" e confermare premendo il tasto "Enter".



MagCore Genomic DNA
Tissue Kit

In questo modo il protocollo relativo all'estrazione del DNA è installato

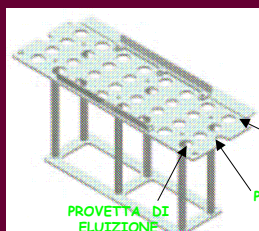
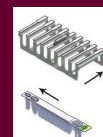
...

... Proseguire con l'inserimento dei dati



Identifichiamo i campioni (Sample Tube) e le provette vuote (Elution Tube)

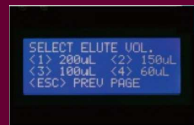
Le Cartridge (MgCore DNA Pre-Filled Cartridge Reagent) vanno inserite correttamente nei Cartridge Racks ...



Posizionare nei T-Racks i puntali, la provetta contenente il campione e la provetta vuota per l'eluizione del DNA come riportato in figura.

È importante posizionare i puntali e le provette nei fori predestinati affinché l'estrazione possa procedere correttamente

Posizionare i T-Racks nello strumento e confermare il posizionamento con "Enter"



Selezionare il volume finale di eluzione e confermare con "Enter"



Da questo punto in poi lo strumento procede automaticamente ...



... un segnale acustico indica che l'estrazione è terminata

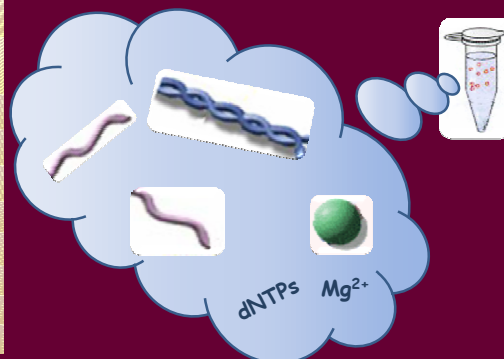
PCR: MASTER MIX

INGREDIENTI

MEAT MIX: miscela "ready to use" contenente dNTPs, $MgCl_2$, Reaction Buffer, dH₂O, Primer biotinilati

Taq

MIX	
Reagenti	Quantità (μl)
Meat mix	22,25
Taq	0,25
Aliquota	22,50
DNA campione	2,50
Totale di reazione	25,00



COMPONENTI di una REAZIONE di PCR

Stampo → DNA a doppio filamento

Primers → Oligonucleotidi complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza DNA bersaglio

Deossiribonucleotidi trifosfati → Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP

Tampone contenente cloruro di magnesio → Lo ione Mg^{2+} è essenziale per il funzionamento dell'enzima

Enzima → Tradizionalmente viene usata la *Taq* polimerasi, enzima termostabile estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*. Permette la formazione del filamento complementare



I FATTORI CRITICI nella miscela di reazione

Non utilizzare quantità eccessive di stampo, primers e/o dNTPs al fine di evitare amplificazioni non specifiche



Dosare accuratamente la $[Mg^{2+}]$ in funzione della quantità di stampo, primers e dNTP utilizzata

Mg^{2+} è indispensabile al funzionamento della *Taq* polimerasi, ma è chelato da stampo, primers e dNTP

Se in eccesso causa una perdita di attività enzimatica

Selezionare l'enzima più idoneo alle proprie necessità

Evitare alla temperatura di denaturazione

Processività

Capacità di correzione degli errori

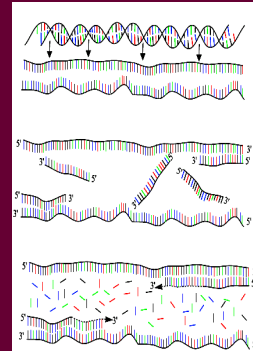


PCR: PROTOCOLLO



Condizioni di reazione	95°C x 5'	
	95°C x 30"	
	60°C x 30"	30 cicli
	72°C x 30"	
	72°C x 10'	
	4°C	

- DENATURAZIONE INIZIALE
- DENATURAZIONE
- APPAIAMENTO
- ALLINEAMENTO
- ALLINEAMENTO FINALE

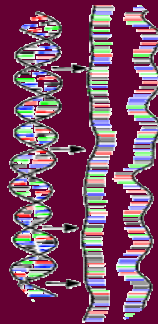


DENATURAZIONE



PRINCIPIO

Perdita della doppia elica per far riformare un "DNA ibrido" target-sonda

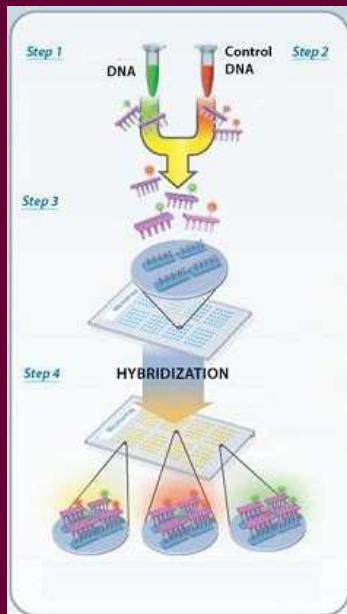


Condizioni di reazione	95°C x 3'
	4°C ∞

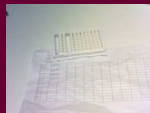


PORRE I CAMPIONI "IMMEDIATAMENTE" IN BAGNO DI GHIACCIO PER BLOCCARE IL PROSEGUO DELLA REAZIONE

REAZIONE DI IBRIDAZIONE



RIFORMAZIONE DELLA
DOPPIA ELICA DEL
DNA TARGET IN CUI
UN FILAMENTO E'
COSTITUITO DAL DNA
ORIGINARIO E
L'ALTRO DALLA
SONDA (DNA IBRIDO)



Organizzare le strip ed i pozzetti in funzione del numero dei campioni e dei controlli da lavorare

Distribuire Hybridation Buffer nelle strip



Distribuire il prodotto PCR nel pozzetto designato



È importante definire preliminarmente l'ordine dei campioni e dei controlli nello schema predefinito

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1																														
2																														
3																														
4																														
5																														
6																														
7																														
8																														
9																														
10																														
11																														
12																														
13																														
14																														
15																														
16																														
17																														
18																														
19																														
20																														
21																														
22																														
23																														
24																														
25																														
26																														
27																														
28																														
29																														
30																														

Incubare nel fornello di ibridazione a 50°C, 1000 rpm e 40 min



LETTURA DEI RISULTATI

COMPLESSO DNA IBRIDO/
REAGENTE DI
BLOCCAGGIO

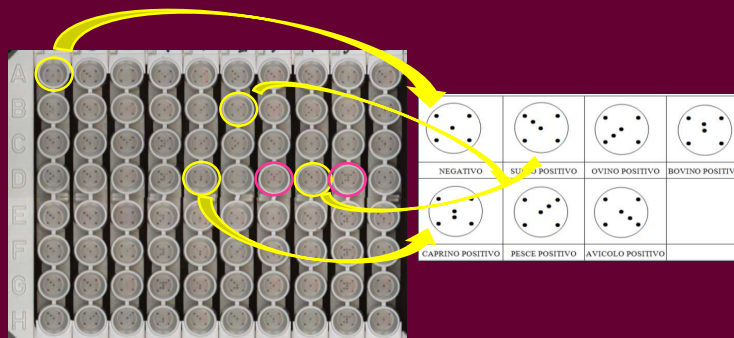
incubare nel fornetto di ibridazione a
50°C per 20 min con agitazione di 1000
rpm

COLORAZIONE POZZETTI
CON (NBT/BCIP) DILUITO
CON IL BUFFER C

REAGENTE di BLOCCAGGIO: streptavidina coniugata
con fosfatasi alcalina (Strep-AP) diluita con il buffer B

INCUBARE AL BUIO PER 7
min

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



Confronto diretto fra i risultati ottenuti (spot accesi: precipitato blu-viola formato in seguito alla reazione enzimatica) nei pozzetti con quelli forniti dalla ditta

VALIDAZIONE DEL METODO

SPECIE: avicola, bovina, caprina, ovina, suina

MATERIALI: DNA estratto da materiali di riferimento e da 79 campioni alimentari a base di carne (n. 18 suino, n.15 bovino, n.1 caprino, n.4 ovino, n.12 pollo, n. 17 carni miste e n.12 altre specie)

METODO: confronto fra la metodica microarray (kit GeneTop Meat™-LifeLineLab, Italia) e PCR end-point "in house" forniti dall' IZSLER (specie caprina e ovina), dall'IZS PLV (specie suina) e dall' IZSUM (specie bovina e avicola)

PARAMETRI:

-SPECIFICITA': "campioni puri" derivanti da specie zoologiche non evidenziate (cavallo, coniglio, bufalo, renna, cervo, capriolo, cinghiale e pesce)

-RIPETIBILITA': tre saggi microarray consecutivi, utilizzando in singola replica, i campioni di controllo (C1-C5)

-SENSIBILITA'

-CONCORDANZA

-LOD

PARAMETRO	VALORE
SPECIFICITA'	≥ 95,0%
RIPETIBILITA'	≥ 95,0%
SENSIBILITA'	≥ 95,0%
CONCORDANZA	≥ 95,0%
LOD	≤ 5,0 ng/rx

RISULTATI

✓CAMPIONI: dei 79 campioni esaminati 58 (73%) sono risultati concordanti, 11 (14%) parzialmente concordanti e 10 (13%) discordanti

✓PARAMETRI:

	Sensibilità	Specificità	Concordanza	LOD	Ripetibilità (calcolata sui controlli C1-C5)
Suino	100.0%	95.8%	97.6%	≥ 3.13 ng	100%
Bovino	100.0%	96.2%	97.6%	≥ 3.13 ng	100%
Caprino	100.0%	100.0%	100.0%	≥ 3.13 ng	100%
Ovino	100.0%	97.5%	97.6%	≥ 3.13 ng	100%
Avicolo	100.0%	96.6%	97.6%	≥ 3.13 ng	100%

CONCLUSIONI

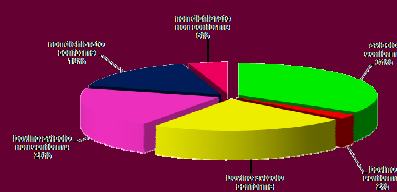
VANTAGGI	SVANTAGGI
RAPIDITÀ DI ESECUZIONE -3 ore -prova unica rispetto 5 separate PCR specie-specifiche	PRESENZA DI FALSI POSITIVI - cervo, renna, capriolo vs ovino - cinghiale vs suino
FACILITÀ DI ESECUZIONE (soprattutto per tanti campioni)	NESSUNA CROSS-REAZIONE "BUFALO-BOVINO"
COSTI CONTENUTI	PROBLEMI CON ALIMENTI COMPLESSI E ALTAMENTE PROCESSATI (mangimi per animali e baby food)
LETTURA AUTOMATIZZABILE	
APPLICABILE SULLA MAGGIOR PARTE DEGLI ALIMENTI IN COMMERCIO	



RISULTATI

Dei 44 campioni, solo il 75% ha prodotto risultati corrispondenti con quanto dichiarato in etichetta

Composizione in etichetta	N. campioni	Specie			
		Bovina	Ovina	Avicola	Suma
Pollo	1	-	-	presente	-
Pollo-tacchino	13	-	-	presente	-
Tacchino	1	-	-	presente	-
Vitello	1	presente	-	-	-
Vitello-pollo-tacchino	1	presente	-	presente	-
Vitello-tacchino	9	presente	-	presente	-
Vitello-tacchino	9	assente	-	presente	-
Non dichiarato	3	-	-	presente	-
Non dichiarato	4	presente	-	presente	-
Non dichiarato	1	-	-	presente	presente
Non dichiarato	1	presente	-	presente	presente



Tra gli 11 campioni non conformi (25%), 2 (5%) si riferiscono a kebab per i quali non era disponibile la composizione, risultati positivi per suino e 9 (20%) a prodotti per i quali era dichiarata in etichetta la presenza di carne bovina ma risultata assente.

Per i 9 campioni risultati privi di indicazioni (20%) non è stato possibile ottenere nessuna informazione circa la specie delle carni utilizzate

CON LA SPERANZA
DI NON AVERVI
ANNOIATO !!!!!



GRAZIE PER L'ATTENZIONE