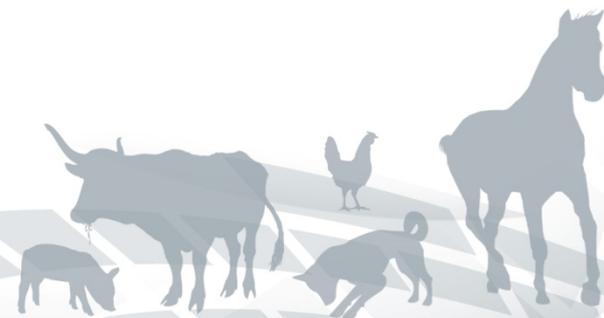




ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Prodotti carnei: identificazione di specie

Marco Di Domenico



Titolo del progetto

Messa a punto, standardizzazione e validazione di metodi molecolari per l'identificazione di specie in prodotti a base di carne

Ricerca Corrente finanziata dal Ministero della Salute Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti



Legislazione

DECRETO LEGISLATIVO 27 gennaio 1992, n.109

Attuazione delle direttive n.89/395/CEE e n.89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari

 **ART. 5**
(Ingredienti)

 10. Le carni utilizzate come ingredienti di un prodotto alimentare sono indicate con il nome della specie animale ed in conformità a quanto previsto all'allegato I.*

*% *grasso e tessuto connettivo*

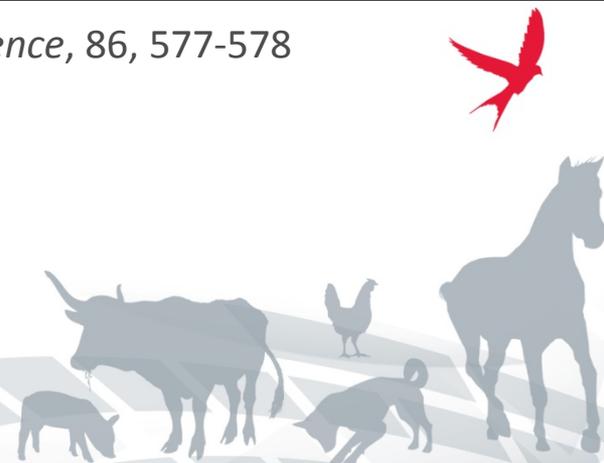


Frodi alimentari: esempi

Table 1
Examples of results from authenticity investigations of meat products.

Investigated product	Country of investigation	Authentication problem	Percentage of mislabelling cases (number of analysed samples)	Reference
Hamburgers	Brazil	Undeclared soy protein	30.8% (39)	Macedo-Silva, Shimokomaki, Vaz, Yamamoto, and Tenuta-Filho (2001)
Hamburgers	Mexico	Undeclared animal species	39% (23)	Flores-Munguia, Bermudez-Almada, and Vázquez-Moreno (2000)
Sausages	Mexico	Undeclared animal species	29% (17)	Flores-Munguia et al. (2000)
Meat products	United States of America	Undeclared animal species	15.9% raw samples 22.9% cooked samples } (902)	Hsieh, Woodward, and Ho (1995)
Meat products	Turkey	Undeclared animal species	22% (100)	Ayaz, Ayaz, and Erol (2006)
Meat products	Switzerland	Thawed meat declared as fresh	15% (43)	Anon (2001)
Meat products	United Kingdom	Thawed meat declared as fresh	8% (534)	Anon (1996)

Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86, 577-578



Frodi alimentari: esempi

LACORS
promoting quality regulation

UK 2009

The study found a major issue with food labelling. 40 per cent of sampled kebabs that provided labelling information did not have an exact declaration for the meat species present. Tests also showed that in 15 per cent of cases beef was found in the kebab, but not declared on the label. In fact, 35 per cent of the labels listed different meat species than that actually contained in the kebab. Alarmingly, six kebabs tested positive for pork when it had not been declared as an ingredient, of which two were claimed as Halal.

nel 40% dei Kebab analizzati risultano
presenti specie non dichiarate in etichetta!



in 6 campioni è presente maiale non dichiarato!!!

حلال halāl ⇒ lecito





ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Tutela del consumatore

sistema di
etichettatura

+

diagnostica di
laboratorio



Diagnostica: metodi immunologici

specie	limite di rilevazione	
	ELISA (cotto)	AGID (crudo)
Bovino	1%	5%
Suino	1%	5%
Ovino	2%	4%
Tacchino/Pollo	1%	8%

- denaturazione
- espressione tessuto-dipendente
- impossibilità di distinguere:

tacchino/pollo (poultry meat) - ovino/caprino



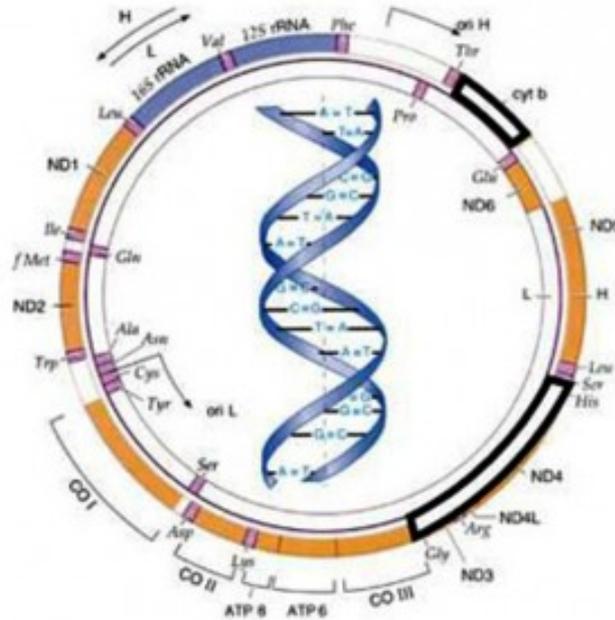
Diagnostica: metodi molecolari

DNA mitocondriale (mtDNA)

- aploide

- specifico

- è presente in numerose copie nella cellula



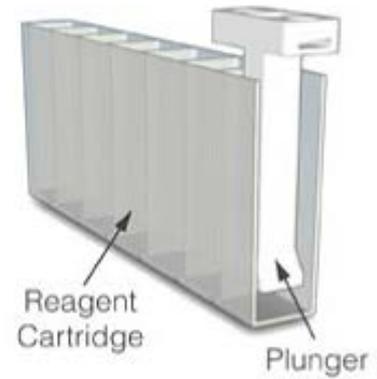
cyt B

16S rRNA



Diagnostica: metodi molecolari

estrazione del DNA



Label end	Contents
1	Lysis Buffer
2	MagneSil® PMPs
3	Wash Buffer
4	Wash Buffer
5	Wash Buffer
6	Wash Buffer
7	Wash Buffer

Ridge end

Maxwell® 16 Instrument (Promega)

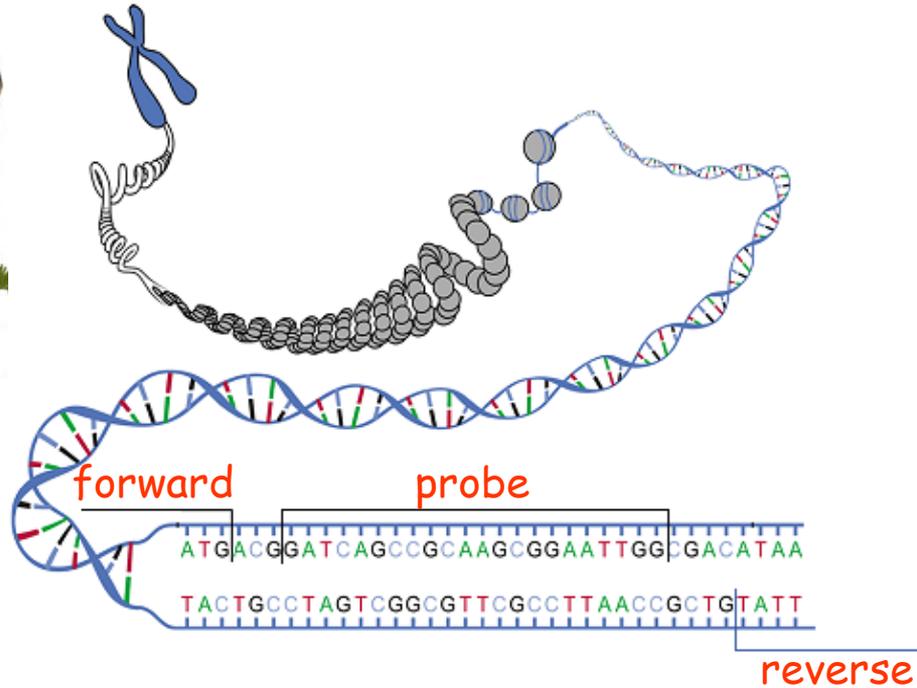




ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Diagnostica: metodi molecolari

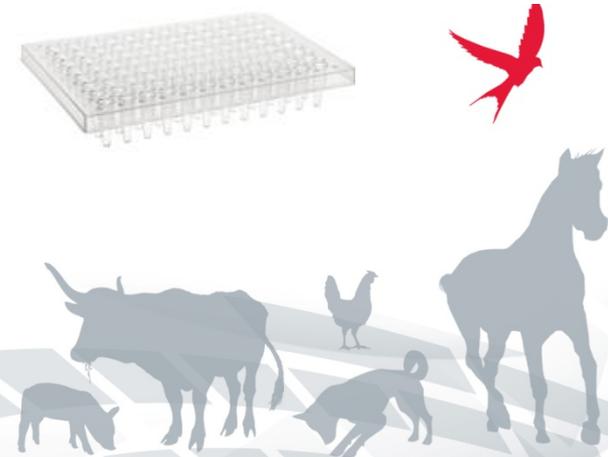
Real Time PCR



Diagnostica: metodi molecolari

HT7900 Fast Real-Time PCR System

(Applied Biosystems)



Risultati efficienza

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

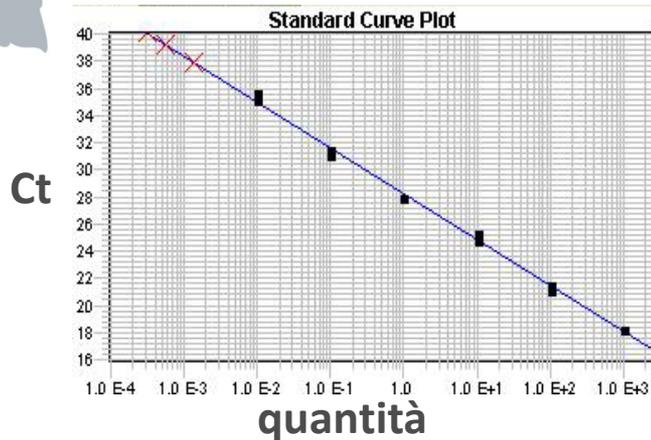
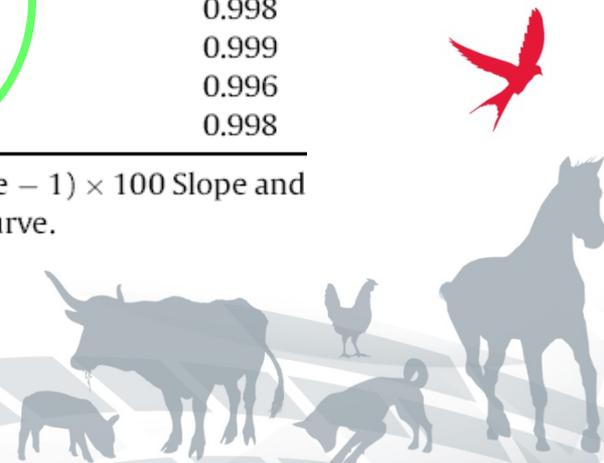


Table 2
Slope, efficiency and R^2 of Real-Time PCR assays.

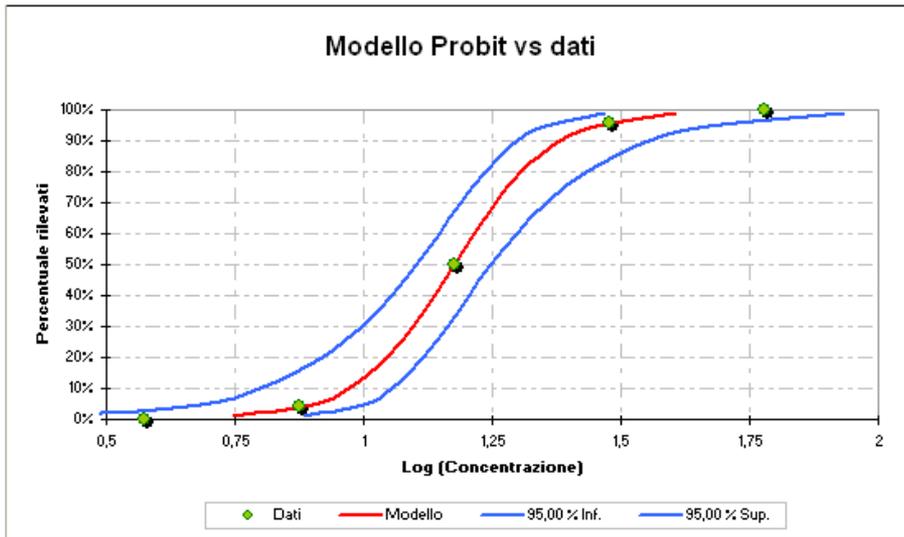
Species	Slope	Efficiency (E)	R^2
Turkey	-3.45	95%	0.993
Chicken	-3.30	100%	0.998
Beef	-3.38	98%	0.999
Pork	-3.34	99%	0.996
Sheep	-3.38	98%	0.998

Efficiency (E) was calculated with the formula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ Slope and coefficient of correlation (R^2) were calculated by standard curve.



Sensibilità e ripetibilità

sensibilità...



24 repliche

per ciascuna delle 5 diluizioni

in 3 prove differenti

...e ripetibilità

$$CV = \text{dev std} / \text{media}$$



Risultati

Table 3
LOD and repeatability.

Species	Statistical test	LOD ^a (cl ^b 95%)	lower cl ^b	upper cl ^b	Repeatability (CV %) ^c
Turkey	Probit analysis	878 fg	682 fg	1.4 pg	1.8
Chicken	Probit analysis	28.3 fg	22.5 fg	46.8 fg	0.7
Beef	Probit analysis	77.4 fg	61.6 fg	119 fg	1.9
Pork	Beta distribution	800 fg	/	/	1.1
Sheep	Probit analysis	20.6 fg	16.1 fg	33.2 fg	1.0

^a limit of detection.

^b confidence limit.

^c coefficient of variation.

DNA

500 pg → 100%

50 pg → 10%

5 pg → 1%

500 fg → 0,1%

50 fg → 0,01%





Specificità

30 replicati per ciascun campione di *carne cruda*

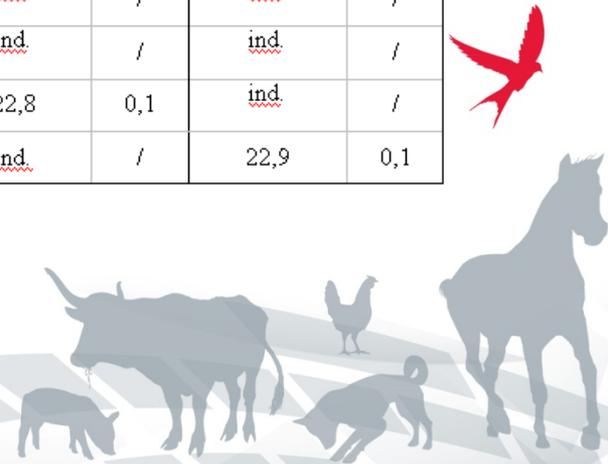
Mix di reazione	tacchino		pollo		bovino		suino		ovino	
	<u>C_t medio</u>	<u>dev std</u>								
tacchino	20,9	0,3	ind.	/	ind.	/	ind.	/	ind.	/
pollo	ind.	/	21,6	0,1	ind.	/	ind.	/	ind.	/
bovino	ind.	/	ind.	/	20,2	0,2	ind.	/	ind.	/
suino	ind.	/	ind.	/	ind.	/	22,6	0,2	ind.	/
ovino	ind.	/	ind.	/	ind.	/	ind.	/	20,8	0,7

specificità

30 replicati per ciascun campione di *carne cotta*

Mix di reazione	tacchino		pollo		bovino		suino		ovino	
	<u>C_t medio</u>	<u>dev std</u>								
tacchino	21,9	0,3	ind.	/	ind.	/	ind.	/	ind.	/
pollo	ind.	/	20,6	0,3	ind.	/	ind.	/	ind.	/
bovino	ind.	/	ind.	/	21,6	0,2	ind.	/	ind.	/
suino	ind.	/	ind.	/	ind.	/	22,8	0,1	ind.	/
ovino	ind.	/	ind.	/	ind.	/	ind.	/	22,9	0,1

100%



Alcune applicazioni



preparato di pollo cotto



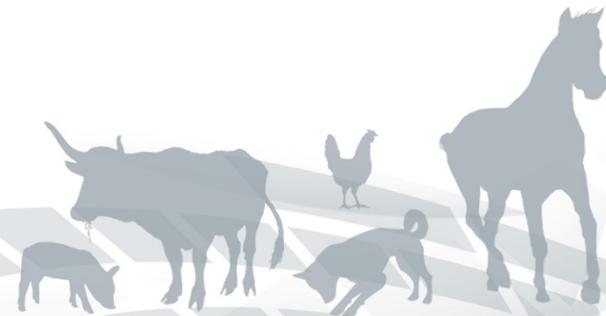
polpette di pollo e tacchino



tortellini

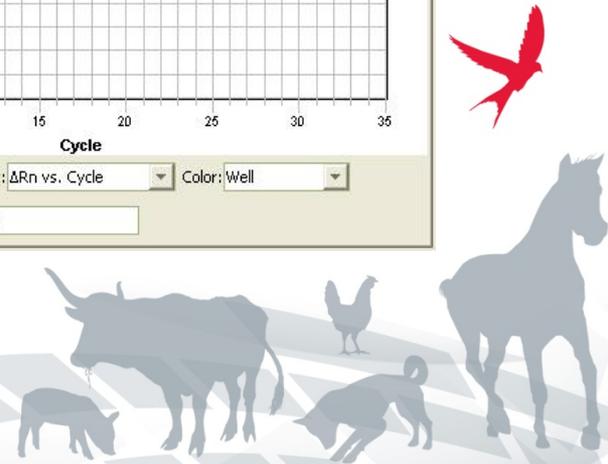
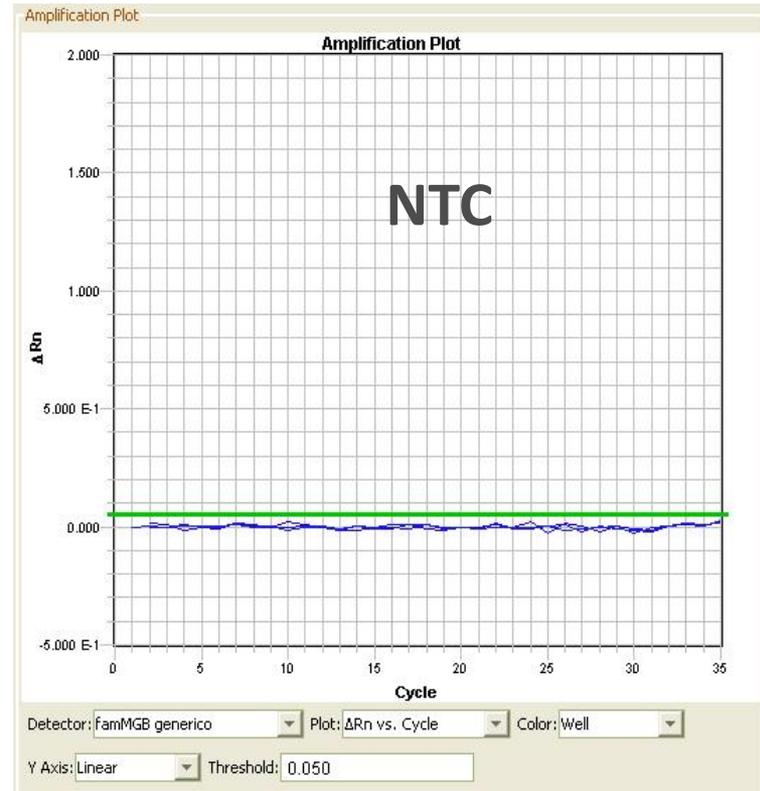


salame di tacchino

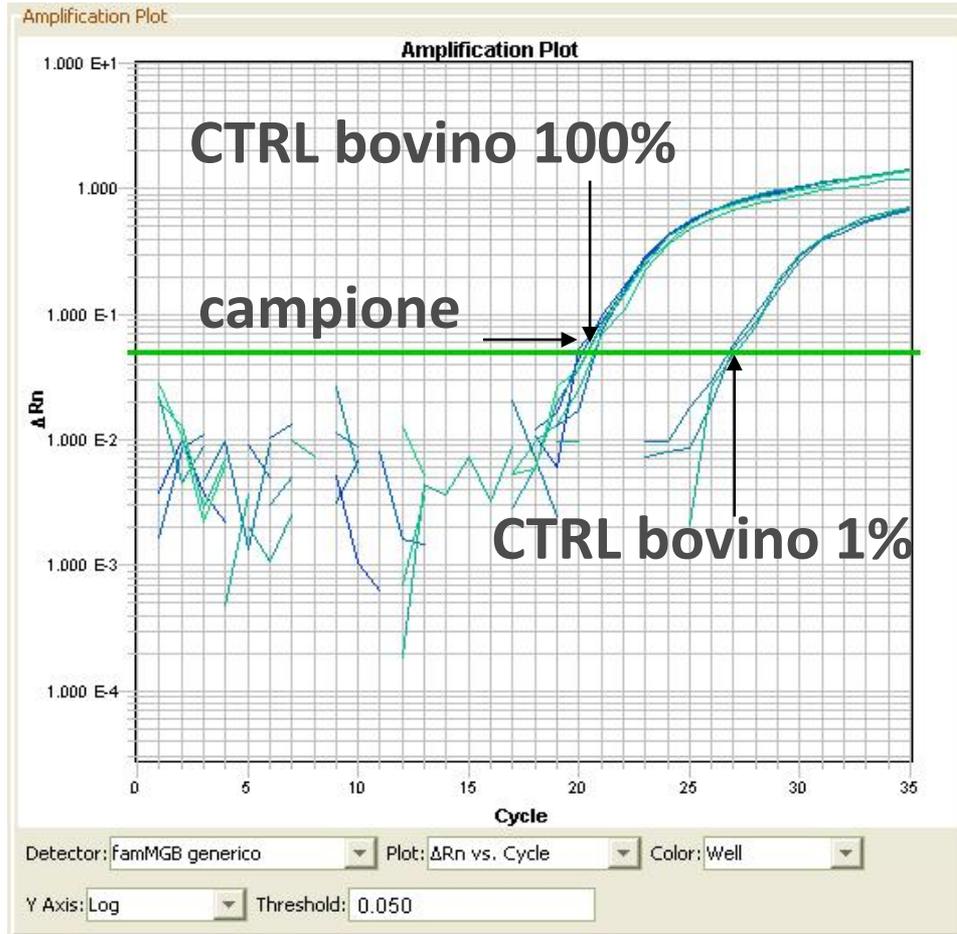


Campione incognito

RealTime PCR bovino



Campione incognito



risultato:
bovino!



Output

- IZS TE B2.1.9 SOP029
 - fascicolo di validazione
 - articolo scientifico

Food Control 23 (2012) 400–404



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Food Control

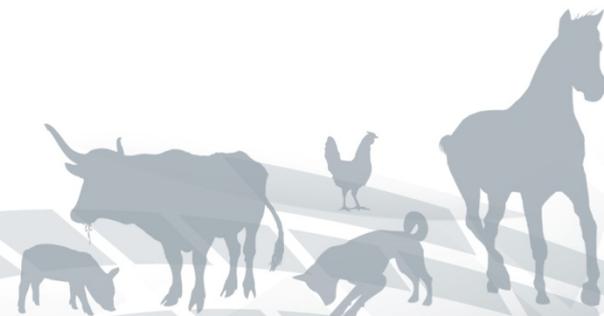
journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures

Cesare Cammà*, Marco Di Domenico, Federica Monaco

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Via Campo Boario, Teramo, Italy



Prospettive future

- utilizzo di altre specie target
 - applicazione ad altre matrici

Tesi di Laurea Specialistica in Biotecnologie Agro-alimentari

*Identificazione di specie in prodotti lattiero-caseari:
applicazione di metodi Real-Time PCR*

Relatori: Nicola Franceschini, Cesare Cammà

Tesista: Marcello Di Giuseppe

