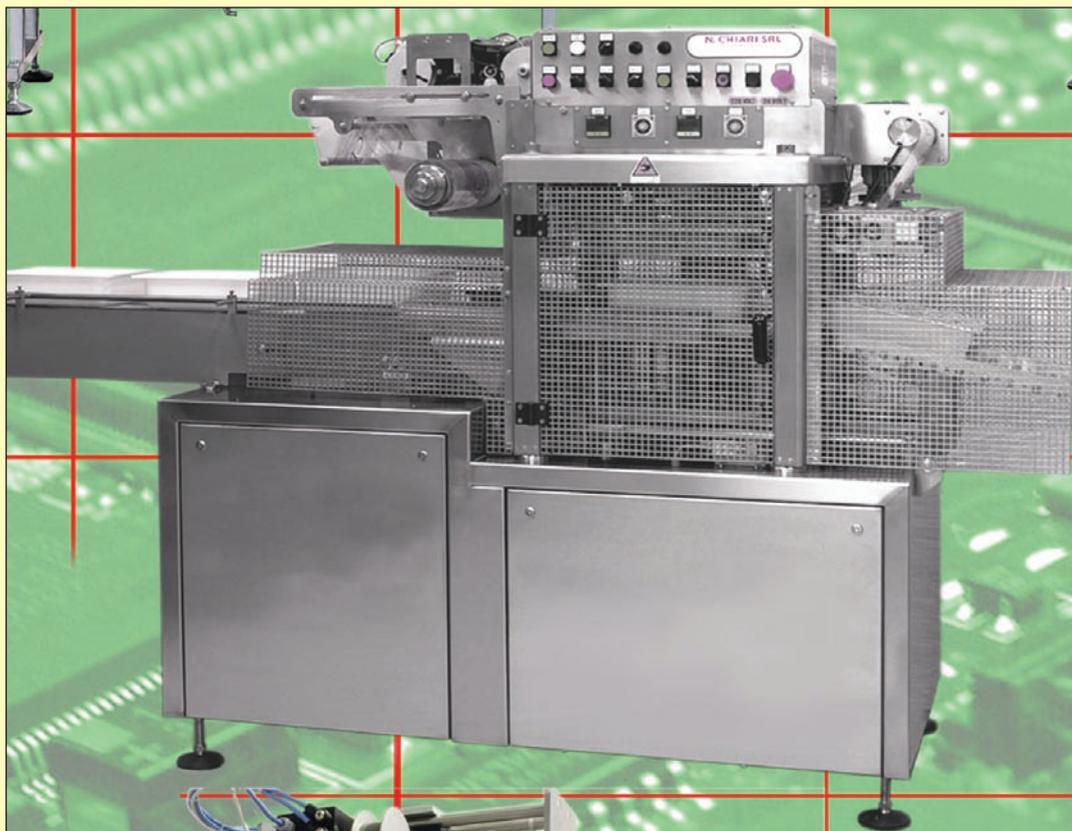


INDUSTRIE ALIMENTARI

SISTEMI ELETTRONICI DI PESATURA DOSAGGIO E CONFEZIONAMENTO



Costruzione
interamente
in acciaio INOX



N. CHIARI s.r.l. - Via E. Fermi, 20 - 25033 Cologne (BS) ITALY - Tel. +39 030715541 - E-mail: nicolachiar@libero.it

**T. CIVERA - M.T. BOTTERO
A. DALMASSO**

Dipartimento di Patologia animale -
Sez. Ispezione alimenti di O.A. -
Università degli Studi - Via L. da Vinci 44 -
10095 Grugliasco - To - Italia

L. PENNISI

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria -
Università degli Studi di Messina

G. FAZIO

Servizio Veterinario - ASL 2 Savonese

Approccio biomolecolare per l'identificazione di specie di una trancia di pesce

A DNA-based approach in species identification of frozen fish

SUMMARY

Part of the cytochrome b (cyt. *b*) and 16S rRNA genes were sequenced to identify a frozen fish steak labelled as "cernia ruvetto" (*R. pretiosus*), common name "oil fish". Authenticated individual of *R. pretiosus* was used as reference: undoubtful identification was done by morphology. Consumption of this species has been reported to have purgative effects in some consumers, and the trade of *R. pretiosus* and other related species in Italy is forbidden.

Alignment of the obtained sequences with those available in GenBank data base was carried out with BLASTn and genetic distances were calculated using the Tamura-Nai model. Reference oil fish showed 100% homology with sequence of *R. pretiosus* available in GenBank, while unknown sample achieved the highest homology with *Lepidocibium flavobrunneum* (97%).

This approach is rapid and offers the potential to detect fraudulent or unintentional mislabelling of seafood. For an unambiguous answer to the question of similarity and intra-species polymorphisms, further authenticated individuals of different geographic origin should be investigated and a greater number of species should be sequenced so as to apply the test as a routine seafood authentication analysis.

SOMMARIO

Si è impiegato il sequenziamento di parte dei geni del citocromo b e dell'unità ribosomiale 16S rRNA per identificare un trancio di pesce congelato etichettato come "cernia ruvetto" (*R. pretiosus*), nome comune "oil fish". Come standard si è utilizzato DNA proveniente da un esemplare di *R. pretiosus* identificato sulla base dei caratteri morfologici. Il consumo di queste carni è documentato provocare effetti purganti in alcuni consumatori, e in Italia ne è vietata la commercializzazione. Le sequenze ottenute sono state allineate con quelle disponibili in GenBank e si è calcolata la distanza genetica impiegando il modello Tamura-Nei. Lo standard noto ha ottenuto un'omologia del 100% con la sequenza di *R. pretiosus* presente in GenBank, mentre il campione dichiarato "cernia ruvetto" ha evidenziato la più alta omologia con *Lepidocibium flavobrunneum* (97%). Questo approccio è rapido ed offre la possibilità di evidenziare frodi o errori nell'etichettatura dei prodotti della pesca. Per poter applicare questa tecnica come analisi di routine è però necessario sequenziare più soggetti di una stessa specie di differente origine geografica al fine di valutare l'esistenza di polimorfismi genetici, nonché ampliare il numero di specie presenti nei database di pubblico accesso.

In Italia l'intero comparto dei prodotti ittici negli ultimi anni mostra un andamento negativo legato sia a deficienze strutturali del settore, sia a cali produttivi. I dati riferentesi al 1997-98 hanno evidenziato che le catture della flotta nazionale sono riuscite a soddisfare un grado di auto approvvigionamento pari al 54,2% del consumo apparente interno ed il 52,4% dell'intera spesa (Schiavo, 2002). L'Italia di conseguenza diventa uno dei principali importatori di prodotti della pesca, con un bilancio di oltre 2800 milioni di dollari nel 1999; nel primo semestre del 2001 sono stati importati 425.707 t di prodotti ittici, di cui il 19,5% costituito da pesce congelato e il 12,3% da pesce fresco.

Si accompagna all'incremento di importazioni, il riscontro di specie alloctone, poco conosciute sui nostri mercati, che rendono complesso il compito delle autorità preposte ai controlli ufficiali sia per quanto concerne la valutazione dell'idoneità sanitaria sia per il controllo delle frodi e dell'etichettatura previsto dall'art. 4 del Regolamento CE 104/2000 e Reg. CE 2065/2001. In quest'ottica, diventa sempre più importante disporre di metodi di laboratorio che consentano di identificare rapidamente le specie oggetto di commercializzazione, soprattutto in presenza di prodotti variamente lavorati, privi di integrità anatomica. Accanto alle

tecniche basate sull'analisi delle proteine, quali l'isoelettrofocalizzazione, gli studi più recenti in questo campo si basano sull'analisi del DNA, principalmente per la sua stabilità anche in prodotti variamente trasformati, e per l'assenza di polimorfismi evidenziati invece per alcune specie con l'analisi proteica (Wolf *et al.*, 2000).

In questo studio si presentano i risultati di indagini biomolecolari per l'identificazione di specie effettuate su una partita di trance di pesce congelato, etichettato come "cernia ruvetto" (*Ruvettus pretiosus*), sequestrato nel corso dell'attività di vigilanza in uno stabilimento di deposito di prodotti della pesca. In particolare si è utilizzata la tecnica del sequenziamento diretto di due frammenti di DNA mitocondriale, impiegando i geni che codificano la piccola unità ribosomiale 16S rRNA e il citocromo b (cyt. b).

MATERIALI E METODI

Campioni

Il prodotto oggetto dell'indagine derivava da una partita di prodotti della pesca provenienti dalla Spagna, costituita da 352 colli del peso di circa 6 kg ognuno, recanti su ciascuna confezione e sui documenti di accompagnamento le indicazioni previste dal Reg. 2065/2001, con la denominazione di "cernia ruvetto" (*Ruvettus pretiosus*). La partita è stata posta sotto sequestro dal servizio veterinario, in ottemperanza alle disposizioni impartite dal Ministero della Sanità con nota n. 600.9.3/24481/AG50/721 del 29/3/2000. Da un collo è stato prelevato un campione per l'effettuazione di indagini biomolecolari.

Come campione di riferimento, si è impiegato un esemplare congelato di *Ruvettus pretiosus*, identificato sulla base delle caratteristiche morfologiche nella sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale della Facoltà di Medicina veterinaria di Messina.

Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA mediante Dneasy Tissue Kit (Qiagen) precedentemente modificato (Bottero *et al.*, 1999) è stata effettuata su 400 mg di muscolo preventivamente scongelato. Il DNA è stato successivamente quantificato mediante spettrofotometro (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) e portato alla concentrazione ottimale di 50 ng/μL.

Oligonucleotidi

Si sono impiegate due coppie di primers universali sintetizzati dalla Roche Diagnostic Monza, la prima in grado di amplificare un frammento di DNA mitocondriale del gene citocromo b (cyt. b) (cyt. b1 e cyt. b2; Kocher *et al.*, 1989) (fig. 1); la seconda disegnata da noi in grado di amplificare un frammento del gene 16S rRNA (univ, univas) (fig. 1).

PCR

Sono state messe a punto due diverse reazioni di PCR su un volume finale di 50 μL (DNA Thermal Cycler 2400 Perkin Elmer). La prima reazione conteneva 20 mM Tris-HCl, (pH 8,4), 1 U di Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 25 pmoli di ciascun primers (L14841, H15149), 250 ng di DNA. I cicli di amplificazione erano costituiti da una prima denaturazione a 94°C per 5 min seguita da 35 cicli di 94°C per 1 min, 50°C per 1 min, 72°C per 2 min.

La seconda era composta da 20 mM Tris-HCl, (pH 8,4), 1 U di Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂,

0,2 mM dNTPs, 25 pmoli di ciascun primers (Univ, Univas), 250 ng di DNA. Lo schema di amplificazione era costituito da una prima denaturazione a 94°C per 5 min seguita da 35 cicli di 94°C per 1 min, 68°C per 1 min e 30 sec, con estensione finale a 72°C per 5 min. Gli ampliconi sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio al 2,5% e visualizzati dopo colorazione con bromuro di etidio.

Purificazione dei prodotti di PCR

Per la purificazione dei prodotti di amplificazione da sottoporre a sequenziamento si è utilizzato il QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) secondo le indicazioni fornite dal produttore.

Sequenziamento

Il cycle sequencing è stato eseguito su un volume finale di 20 μL, in ogni reazione erano presenti: 5 pmoli dei primers senso o antisense dei due geni utilizzati, i ddNTPs terminatori marcati con rodamina. Il sequenziamento è stato effettuato mediante ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Analisi delle sequenze

Le sequenze ottenute sono state elaborate mediante il programma CROMAS 2.0 (Technelysium).

Per calcolare l'omologia con altre sequenze depositate e tra la sequenza dello standard e quella del campione oggetto di indagini, si sono impiegati rispettivamente i programmi BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) e CLUSTAL X (Higgins *et al.*, 1992).

Primers	Posiz.	Sequenza oligonucleotidica	Amplicone (bp)
Cyt.b 1 Cyt.b 2 (Kocher et al., 1989)	14816 15174	5CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3 5GCCCCCTCAGAATGATATTTGTCTCA 3	359 bp
Univ Univas (N.C.001567)*	2509 2742	5 AGACGAGAAGACCCTRTGGARCTTTA 3 5GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA 3	234-265 bp

* codice di accesso GenBank; R=A/G.

Fig. 1.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI ▾

Ruvettus pretiosus, fam. *Gempylidae*, è un pesce di grande dimensione – fino a 300 cm – bentopelagico, diffuso nella zona subtropicale tra il 55° N e 35°S, pescato occasionalmente anche nel Mediterraneo al largo delle coste sicule, solitamente in concomitanza con la pesca di tonni. In alcune zone della Spagna, e in particolar modo nelle isole Canarie, questa specie viene spesso consumata per risolvere fenomeni di stipsi (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1997). Il consumo di carni di *R. pretiosus* è stato più volte segnalato quale causa di diarrea di intensità variabile (Pellegrino *et al.*, 2000), patologia legata alla presenza di una sostanza indicata come gempylotossina. Studi recenti (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1997; Nichols *et al.*, 2001) hanno evidenziato che l'effetto purgativo è legato all'elevata presenza di lipidi non saponificabili nelle carni non solo di *R. pretiosus* ma anche di *Lepidocybium flavobrunneum*. L'analisi dei lipidi ha infatti evidenziato che circa il 90% dei grassi presenti a livello della muscolatura sottocutanea, ventrale e dorsale sono costituiti da cere, che consentono al pesce di vivere a grandi profondità senza eccessivo consumo di energia (Ruiz-Gutierrez *et al.*, 1997).

La segnalazione di episodi diarroici legati al consumo di queste carni, ha indotto il Ministero della Sanità, su parere dell'Istituto Superiore di Sanità e del Centro Ricerche Marine di Cesenatico, a vietare la commercializzazione di queste carni; negli USA vige la raccomandazione del CF-SAN-FDA di non importare e commercializzare carni di *R. pretiosus* e *L. flavobrunneum* a causa dell'effetto purgativo esercitato dall'olio. A fronte di queste indicazioni, occorre tuttavia segnalare che queste stesse specie, unitamente a *Gempylus serpens*, vengono inserite, sotto la denominazione di tirsite, fra i prodotti della pesca per i quali è ammesso un tenore massimo di 1 mg/kg di mercurio nel Reg. CE 221/2002: dal momento che tale re-

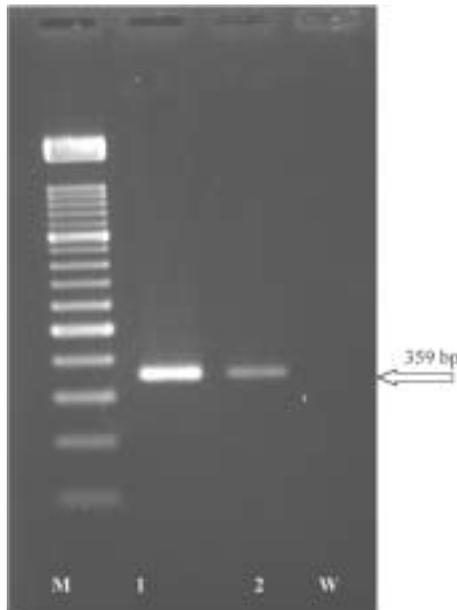


Fig. 2 - Amplificazione di un frammento (359 bp) del gene *cyt. b* (DNA mitocondriale): M 100 bp ladder (Roche); 1. Campione standard; 2. Campione sequestrato; W Controllo reagenti.

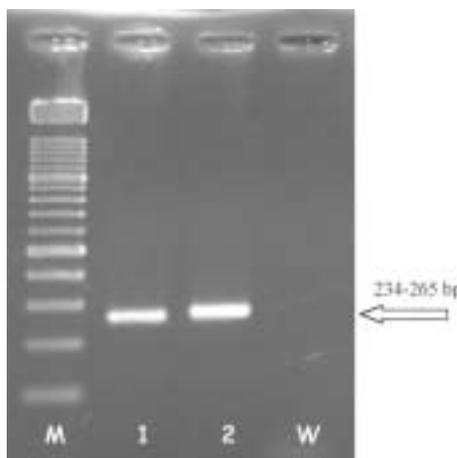


Fig. 3 - Amplificazione di un frammento (bp) del gene 16S (234-265 bp) (DNA mitocondriale): M 100 bp ladder (Roche); 1. Standard di *Ruvettus pretiosus*; 2. Campione sequestrato; W Controllo reagenti.

golamento ha la finalità di tutelare la salute pubblica, si deduce che queste specie vengano considerate edibili. L'analisi del DNA è stata pertanto condotta al fine di verificare se le trance in questione appartenessero realmente alla specie

indicata nella documentazione allegata alla partita. Tanto il campione standard di *R. pretiosus* quanto il campione prelevato dalla partita sequestrata sono stati sottoposti a PCR impiegando le due diverse coppie di primers. In entrambi i casi è stato possibile mettere in evidenza il prodotto amplificato di 359 bp (gene del *cyt. b*), e di 234-265 bp (gene 16S rRNA): in quest'ultimo caso la lunghezza variabile è dovuta alla presenza di delezioni all'interno del frammento (fig. 2 e 3).

Le sequenze nucleotidiche analizzate con BLASTn hanno evidenziato per il prodotto di PCR ottenuto con i primers del *cyt. b* un'omologia del 100% nel caso del campione da noi impiegato come standard di riferimento con *R. pretiosus*, mentre per il campione sequestrato la specie che evidenzia maggiore omologia è *Lepidocybium flavobrunneum* (97%), per la quale si ha appaiamento di 261 su 269 basi. Al fine di valutare la distanza genetica tra la sequenza del campione oggetto di sequestro e le specie con una maggiore omologia sulla base dei risultati ottenuti con BLASTn, si è costruito un albero filogenetico (fig. 4): l'analisi è stata condotta impiegando MEGA versione 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). I risultati confermano la vicinanza filogenetica del campione oggetto di sequestro con la famiglia *Gempylidae*, e in particolare con *L. flavobrunneum*. Lo studio delle divergenze dei nucleotidi nelle sequenze del *cyt. b* è ampiamente consolidato per la valutazione di relazioni filogenetiche nei pesci e negli altri vertebrati: all'interno dello stesso genere raramente superano il 20%, con l'eccezione dei Clupeiformi (Jérôme *et al.*, 2003) e questo approccio potrebbe essere seguito per la differenziazione di specie. A questo scopo è tuttavia necessario che vengano sequenziate non solo un numero maggiore di specie, ma anche, entro la stessa specie, soggetti di diversa origine, al fine di validare il metodo.

Per quanto riguarda la regione 16S rRNA occorre premettere che si tratta di un gene studiato in special modo nei procarioti, mentre le informazioni disponibili negli

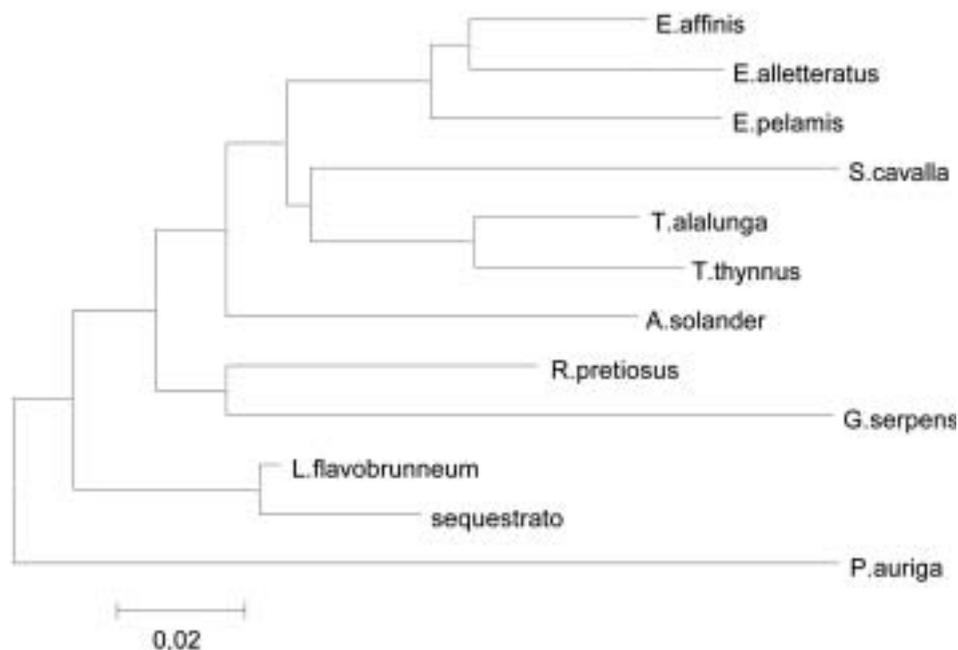


Fig. 4 - Albero filogenetico costruito impiegando Tamura-Nei distance matrix.

L'amplificazione di ben precise regioni del DNA mitocondriale, in particolare del cyt. *b*, seguita da sequenziamento e/o analisi dei siti di restrizione (RFLP) è già stata impiegata con successo da altri autori nei prodotti della pesca per identificare specie di interesse commerciale (Ram *et al.*, 1986; Quinteiro *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 2000; Jérôme *et al.*, 2003). La scelta della regione deve tener conto di alcuni elementi fondamentali quali contenere informazioni sufficienti per distinguere le specie di interesse, e, nel contempo, avere un basso livello di variabilità intraspecifica (Quinteiro *et al.*, 1998); inoltre nel caso di prodotti sottoposti a trattamenti altamente denaturanti, quali le conserve, la lunghezza del frammento deve tener conto della frammentazione del DNA operata dal calore. Il confronto della sequenza di un frammento di DNA proveniente da un campione sconosciuto con le sequenze di quello stesso frammento di diversi individui della specie da cui si intende differenziare (nel nostro caso *R. pretiosus*) permette di stimare la distanza genetica.

eucarioti, e in particolare per quel che concerne i pesci, sono ancora piuttosto limitate. Questa regione è caratterizzata dalla presenza di zone altamente conservate alternate ad altre ipervariabili: l'allineamento con CLUSTAL X della sequenza

dello standard di *R. pretiosus*, identificato sulla base dei caratteri morfologici, con la sequenza ottenuta nel campione sequestrato evidenzia molte differenze (fig. 5), consentendo di concludere che si tratti di specie differenti.



Fig. 5 - Allineamento con CLUSTAL X (1.8) delle sequenze del campione sequestrato (C16S) e dello standard di *R. pretiosus* (s16S). Il simbolo "*" indica omologie fra le basi; "-" delezioni.

I risultati del sequenziamento dei frammenti ottenuti con entrambe le coppie di primers, ci permettono di escludere che la trancia esaminata appartenesse a *R. pretiosus*, come segnalato invece in etichetta: l'analisi filogenetica sembra indicare si tratti di una specie vicina piuttosto a *L. flavobrunneum*, altro gempillide commercializzato sotto il nome di "escolar" con composizione lipidica analoga a *R. pretiosus*.

Benché l'UE con la pubblicazione del Reg. 2065/2001 abbia voluto dare una forte spinta alla rintracciabilità dei prodotti della pesca mediante il sistema di etichettatura, gli operatori spesso si trovano in gravi difficoltà ad identificare esattamente la specie, soprattutto in presenza di prodotti inusuali per i nostri mercati. L'analisi del DNA può portare un forte contributo positivo non solo permettendo di riconoscere esattamente quanto si va ad immettere sul mercato, consentendo quindi una corretta etichettatura, ma anche contribuendo a migliorare la sicurezza degli alimenti e, di conseguenza, la fiducia del consumatore. Per giungere a ciò è necessaria una politica che comprenda appieno questa necessità e si destinino risorse apposite per la creazione di un database di pubblico dominio con le sequenze, almeno relativamente al cyt. *b*, delle specie ittiche di interesse commerciale.

BIBLIOGRAFIA

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. – Basic alocal alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410, 1990.
- Bottero M.T., Civera T., Turi R.M., Rosati S. – Impiego della Polymerase Chain Reaction (PCR) nel controllo delle frodi legate alla sostituzione di specie in prodotti sottoposti ad alte temperature. *Industrie Alimentari* 38, 18-20, 1999.
- Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R. – CLUSTAL W: improved software for multiple sequence alignment. *Computer Application in the Biosciences* 8, 4420-4449, 1992.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A. Edwards S.V., Paabo S., Villablanca F.X., Wilson A.C. – Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 86, 6196-6200, 1989.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. – MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics* 17, 12:1244-1245, 2001.
- Jérôme M., Lemaire C., Bautista J.M., Fleurence J., Etienne M. – Molecular phylogeny and species identification of sardines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 43-50, 2003.
- Ministero della Sanità – Nota 600.9.3/24481/AG50/721 del 29/3/2000: D.L.vo 531/92 Biotossine marine Gempylotossina.
- Nichols P.D., Mooney B.D., Elliott N.G. – Unusually high levels of non-saponifiable lipids in the fishes escolar and rudderfish. Identification by gas and thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 936, 183-191, 2001.
- Pellegrino C., Cianti L., Boccetti M. – Indagine epidemiologica su 4 casi di intossicazione da consumo di carni di *Ruvettus pretiosus*. *Atti X Convegno Nazionale AIVI, Marsala, 12-14 ottobre 2000*, 245-249, 2000.
- Quinteiro J., Sotelo C.G., Rehbein H., Pryde S.E., Medina I., Péres-Martin R.I., Rey-Méndez M., Mackie I.M. – Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1662-1669, 1998.
- Ram J.L., Ram M.L., Baidoun F.F. – Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of Polymerase Chain Reaction products of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2460-2467, 1996.
- Reg. CE n. 104 del 17 dicembre 1999 relativo all'organizzazione comune dei mercati per i prodotti della pesca e dell'acquacoltura. *G.U.C.E. L17 del 21.1.2000*, 22-52.
- Reg. CE n. 2065 del 22 ottobre 2001 che stabilisce le modalità di applicazione del Regolamento (CE) 104/2000 del Consiglio per quanto concerne l'informazione dei consumatori nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura. *G.U.C.E. L278 del 23.10.2001*, 6-8.
- Reg. CE n. 221 del 6 febbraio 2002, modifica il Reg. CE n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. *G.U.C.E. L37/4 del 7.2.2002*, 4-7.
- Ruiz-Gutierrez V., Perez-Zarza M.C., Muriana F.J.G., Bravo L. – Lipid and fatty acid composition of muscle and internal organs from *Ruvettus pretiosus*. *Journal of Fish Biology* 50, 1353-1357, 1997.
- Schiavo A. – Pesca ed autoapprovvigionamento interno: limiti e prospettive. *Il Pesce* 19, (2), 75-85, 2002.
- Wolf C., Burgener M., Hübner P., Lüthy J. – PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 33, 144-150, 2000.