

## LA TRACCIABILITA' GENETICA NELLA FILIERA BOVINA MEDIANTE ANALISI DEGLI SNPs

Capoferri R., Galli A., Bongioni G.

*Istituto Sperimentale Italiano "L. SPALLANZANI" - Viale Forlanini, 23 - 20133  
Milano, Italia*

**RIASSUNTO** - Attualmente la tracciabilità nei prodotti di origine bovina è di primaria importanza sia per l'applicazione del Regolamento della Commissione Europea (CE 178/2002) sia come risposta alle richieste del consumatore che predilige prodotti sicuri. Questo sistema come tutti i processi di filiera, è passibile di errori o disguidi che determinano la perdita del legame tra il codice identificativo dell'animale e l'animale stesso. Risulta per tanto necessario disporre di un metodo basato sull'analisi del DNA in grado di supportare e verificare la tracciabilità ordinaria. Lo scopo di questo lavoro è stata la verifica della corretta etichettatura in tre momenti della filiera della carne bovina (azienda, macello e punto vendita) mediante un protocollo in Real Time PCR basato sull'analisi di mutazioni puntiformi (SNPs).

**PAROLE CHIAVE:** Carne, Tracciabilità, SNPs, Real-time PCR.

### INTRODUZIONE

L'articolo 18 del Regolamento (CE) N.178/2002 del Parlamento Europeo del Consiglio del 18 gennaio 2002 definisce la tracciabilità 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 di produzione, della trasformazione e della distribuzione". Il sistema di tracciabilità si basa sulla codifica e sulla documentazione delle diverse fasi della filiera produttiva. Tali informazioni consentono di ricostruire la storia del prodotto finito.

I capi bovini attualmente sono identificati da una matricola riportata sia sui marchi auricolari apposti ad entrambi gli orecchi dell'animale sia sul documento dove vengono registrati i dati anagrafici dell'animale stesso (passaporto).

Durante le fasi di trasformazione del prodotto (macellazione, sezionamento, confezionamento e distribuzione nei punti vendita) tale matricola o altra codifica a questa collegata deve essere riportata sull'etichetta, come previsto dal regolamento CE 1760/2000. Questo sistema di tracciabilità convenzionale è però soggetto ad errori o disguidi che determinano la perdita del legame tra il codice identificativo dell'animale e l'animale stesso. L'analisi genetica-molecolare in questo contesto rappresenta un utile strumento per l'autenticazione e il controllo dei sistemi di tracciabilità ordinaria, in quanto confrontando regioni specifiche del DNA permette di verificare se campioni biologici prelevati nei diversi momenti della filiera produttiva (mezzene, sezionamenti, tagli-porzioni commerciali) appartengano o meno all'animale il cui codice è riportato sull'etichetta. L'analisi del DNA può essere effettuata con l'utilizzo di differenti marcatori genetici come AFLP (polimorfismi di lunghezza di frammenti amplificati), RFLP (polimorfismi di lunghezza di frammenti generati da enzimi di restrizione), VNRT (polimorfismi dovuti alla ripetizione in tandem di un numero variabile di nucleotidi) e SNPs (polimorfismi legati alla mutazione di un singolo nucleotide). Questi marcatori differiscono per gradi di polimorfismo, per la possibilità di standardizzare i protocolli di analisi, per l'interpretazione dei dati e per la strumentazione richiesta. Attualmente gli SNPs rappresentano un approccio innovativo per gli studi di genotipizzazione in quanto sono molto abbondanti nel genoma, sono geneticamente stabili e facili da impiegare in un'analisi di routine (Syvänen 2001; Vignal *et al.*, 2002). Fino ad oggi, nei bovini sono stati resi noti 69 SNPs altamente informativi (Heaton *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2004) e di recente è stato messo a punto un metodo innovativo per la discriminazione degli SNPs basato sulla Real Time PCR

testato su diverse razze, tra le quali Chianina e Marchigiana (Capoferri *et al.*, 2004). Scopo del lavoro è stato quello di verificare l'utilizzo degli SNPs nella gestione "tracciabilità genetica" a livello di filiera di produzione della carne bovina.

## MATERIALI E METODI

**Campionamento.** In diversi allevamenti, associati al Consorzio Carne Bovina Documentata e regolarmente registrati all'Anagrafe Nazionale Bovina, sono stati prelevati campioni di pelo da 2000 soggetti. Tali campioni raccolti in sacchetti recanti l'identificativo del bovino sono stati spediti al Laboratorio di genetica molecolare dove sono stati stoccati. Tutte le informazioni relative al soggetto sono state archiviate in un database (matricola e dati anagrafici). Dei 2000 soggetti ne sono stati campionati 188 effettuando prelievi di carne sia al macello che presso i diversi punti vendita. I soggetti analizzati erano ripartiti nelle seguenti razze: Frisone Italiana (122), Meticcio (33), Charolaise (21), Pezzata Nera (9), Limousine (1), Blonde Aquitaine (1) ed Auberac (1). I 376 campioni di carne muniti ciascuno di un codice a barre o della matricola sono stati inviati al Laboratorio di Genetica Molecolare per l'analisi.

**Analisi genético-molecolare.** Il DNA genomico è stato isolato da 10 mg di muscolo mediante l'utilizzo di un estrattore semi automatico di DNA (ABI PRISM 6100 Nucleic Acid Prepstation) e la relativa chimica (Nuc Prep genomic DNA chemistry). Il DNA genomico è stato estratto dai peli utilizzando la PrepMan Ultra (Applied Biosystems) partendo da 10-15 bulbi. Il DNA è stato amplificato utilizzando un pannello di 12 SNPs. In tabella 1 sono elencati i loci indagati, il numero di accesso per la consultazione in banca dati e le sequenze dei primer utilizzati per la Real Time PCR. In particolare la discriminazione allelica è stata valutata simultaneamente utilizzando per ciascun locus una coppia di primer ed una coppia di sonde (una per ciascuna mutazione) marcate con due differenti fluorocromi. Le reazioni di PCR sono state allestite in una miscela di 12,5 µl contenente 1-25 ng di DNA genomico, 6,25 µl di 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 0,3 µl di 20x SNP Genotyping Assay Mix (specifico per ciascun polimorfismo). Le amplificazioni sono state realizzate utilizzando lo strumento Sequence Detection System ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). Il ciclo di amplificazione è stato eseguito utilizzando il seguente protocollo: un'incubazione a 50°C per 2' per l'attivazione dell' AmpErase UNG Activation, un' incubazione a 95°C per 10' per l'attivazione dell' AmpliTaq Gold Polimerasi e 40 cicli costituiti ciascuno da due fasi, una denaturazione a 92°C per 15'' ed una fase di annealing-estensione a 60°C per 1'. Durante la PCR la sonda fluorescinata si appaia perfettamente al filamento bersaglio e durante l'estensione viene degradata con conseguente emissione di fluorescenza. Alla fine dell'amplificazione la fluorescenza di ciascun campione è stata scomposta nelle 2 componenti FAM e VIC ed il genotipo per ciascun locus è stato determinato dalla loro differenza ( $\Delta Rn$ ). In particolare il prevalere di una componente sull'altra è dovuto alla presenza di un genotipo omozigote, mentre la rilevazione di entrambe è legata alla presenza di un genotipo eterozigote (fig.1). I dati genetici relativi ai campioni di riferimento sono stati utilizzati per l'analisi statistica. In particolare per ciascuno SNP sono state calcolate le frequenze genotipiche della popolazione in analisi.

**Verifica della tracciabilità ordinaria.** I genotipi ottenuti dai campioni di riferimento sono stati confrontati con i genotipi dei campioni prelevati nei due momenti della filiera indagati (macello e punto vendita) per verificare la correttezza della tracciabilità ordinaria.

## DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Le frequenze genotipiche per ciascun locus sono riportate in tabella 2. La probabilità, calcolata sulle frequenze genotipiche, che due individui, scelti a caso nella popolazione di interesse, avessero lo stesso genotipo era  $1 \times 10^{-4}$ . Dei 188 soggetti analizzati 2 sono risultati identici per il pannello di SNPs utilizzato, pur non essendo imparentati. Il confronto dei 188 genotipi del DNA di riferimento con i rispettivi genotipi del DNA dei campioni in analisi è risultato corretto

per 181 soggetti. Si sono evidenziate complessivamente 7 non conformità, 5 delle quali probabilmente imputabili ad una errata gestione dei peli campionati in azienda.

### CONCLUSIONI

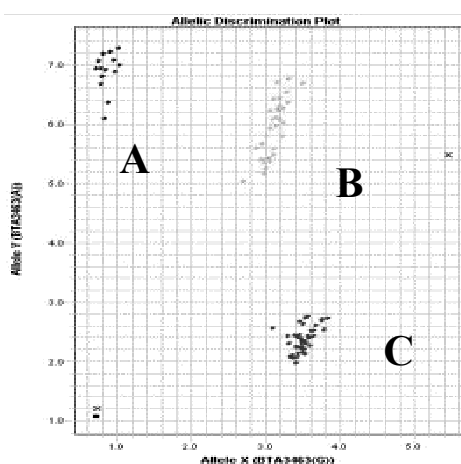
Il lavoro svolto ha confermato un buon livello di attendibilità della tracciabilità ordinaria in quanto si sono ottenuti esiti corretti per il 96% dei soggetti analizzati. L'analisi genetica tramite SNPs è risultata quindi un utile strumento per certificare tutte le informazioni riportate sull'etichetta garantendo l'origine del prodotto e valorizzando i prodotti tipici e/o i prodotti di origine controllata.

Tabella 1– Elenco primers per la genotipizzazione del DNA genomico dei bovini  
 Table 1 – Oligonucleotide primers and features of amplified bovine genomic DNA

Nome Locus <i>Locus identifier</i>	N. Accesso <sup>a</sup> <i>Accession N.<sup>a</sup></i>	Sequenza primers forward <i>Primers Forward Sequence</i>	Sequenza primers reverse <i>Primers Reverse Sequence</i>
BTA2121	AF465164	gggttcacgtcccctcaca	aatgttggcaaaacaatgtctgttaca
BTA2889	AF465169	gctagtctggaccagcttcca	gttgcagagaagtagcctggg
BTA3144	AF465167	gagggagaggagactctctt	gagccggctgaggatgaa
BTA3250	AF458963	ctactggcctttgatctgactagttc	aggaccttctcactgggtattaa
BTA3463	AF465172	ggccccactctcaaatctga	ggagatctagaacctctgggaaag
BTA4083	AF465157	gggtccgtgaaaagactgta	ttcctgtgacttctctcatagtg
BTA5033	AF465162	gggagtggagagtggattgg	cccctttgtacagatggagaaact
BTA5089	AF465163	ggcagaggaggagaaagaatcattt	agagatgtaataaagcagccatgct
BTA5277	AF465158	ggaggcgttccgtctgt	ctaccaggctgcccttactc
BTA5915	AF465177	cctcgggccagcaactc	gccggaggcgactacag
BTACAPN1	AF465178	acaacagccatctactgccttt	ggaggtctagtggagcaagaggaa
BTAIL8	AF465155	aggatgtccagttatattgaatattaag taaaacaatga	atttctaaaatataagcatgtctctacatggaa ca

<sup>a</sup> Website: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

Figura 1 – Grafico di discriminazione allelica per BTA3463  
 Figure 1 – Discrimination Plot for BTA3463



**A** omozigote AA ( solo FAM)  
**B** eterozigote AG (FAM e VIC)  
**C** omozigote GG (solo VIC)  
 ■ controllo negativo  
 x campione non determinato

*A* Homozygous AA ( only FAM)  
*B* Heterozygous AG (FAM and VIC)  
*C* Homozygous GG (only VIC)  
 ■ Negative Control  
 x Undetermined sample

Tabella 2 –Frequenze Genotipiche osservate per i singoli SNPs

Table 2 – Genotype frequencies of SNPs

Nome Locus <i>Locus Identifier</i>	Alleli (1,2) <sup>a</sup> <i>Alleles (1,2)<sup>a</sup></i>	Frequenze genotipiche <i>Genotype frequencies</i>		
		(1,1) <sup>b</sup>	(1,2) <sup>c</sup>	(2,2) <sup>d</sup>
BTA2121	G,T	0.49	0.38	0.12
BTA2889	T,C	0.02	0.28	0.69
BTA3144	T,G	0.30	0.52	0.18
BTA3250	G,A	0.21	0.52	0.27
BTA3463	C,T	0.07	0.41	0.52
BTA4083	T,C	0.60	0.22	0.08
BTA5033	T,C	0.54	0.39	0.06
BTA5089	G,T	0.80	0.19	0.01
BTA5277	C,T	0.01	0.66	0.33
BTA5915	T,C	0.04	0.32	0.65
BTACAPN1	C,T	0.67	0.29	0.04
BTAIL8	T,C	0.38	0.42	0.02

<sup>a</sup> Allele 1 e allele 2 marcati in VIC e FAM;

<sup>b</sup>Omozigote per allele 1; <sup>c</sup>Eterozigote per allele 1 e 2; <sup>d</sup> Omozigote per allele 2.

<sup>a</sup> Allele 1 and allele 2 labelled with VIC and FAM;

<sup>b</sup>Homozygosity for allele 1; <sup>c</sup>Heterozygosity for allele 1 and 2; <sup>d</sup> Homozygosity for allele 2.

#### BIBLIOGRAFIA- REFERENCES

- Capoferri R., Galli A., Bongioni G., 2004, Atti 39° Simposio Internazionale di Zootecnia 273-279.
- Heaton M. P., Harhay G.P., Bennet G.L., Stone R.T., Grosse W.M., Casas E., Keele J.W., Smith T.P.L., Chitko-McKown C., Laegreid W.W 2002. Mam. Gen.13, 272-281.
- Syvänen A.-C., 2001, Nature Reviews-Genetics 2, 930-942.
- Vignal A. Milan D., SanCristobal M., Eggen A., 2002, Gen. Sel. Evol. 34, 275-305.
- Werner F.A.O. Durtsewitz G., Habermann F.A., Thaller G., Krämer W., 2004, Anim. Gen. 35, 44-49.

#### RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il dr. Barreca, il dr. Miotti ed il dr. Mondadori del Consorzio Carne Bovina Documentata ed il macello INDAL ad esso convenzionato per la collaborazione prestata. Il lavoro è stato svolto nell'ambito di un progetto finanziato dalla Regione Lombardia.

## MOLECULAR TRACEABILITY IN MEAT PRODUCING ANIMALS BY SNPs

Capoferri R., Galli A., Bongioni G.

**ABSTRACT** - According to the application of the European Commission Regulations and in response to the new demand of consumers, the traceability of livestock and meat is at present an essential tool. The development of molecular analytical methods, based on storage of reference samples and DNA analysis, is necessary to guarantee the documentary traceability. The aim of this work was to verify the correct labelling at three different moments in the bovine meat chain production (farm, slaughter and point of sale) by a protocol in Real Time PCR based on single nucleotide polymorphism analysis.

**KEYWORDS:** Meat, Traceability, SNPs, Real-time PCR.

## **INTRODUCTION**

According to the article 18 of the Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament the traceability of food, feed, food-producing animals and any other substance intended to be, or expected to be, incorporated into a food or feed shall be established at all stages of production, processing and distribution. The traceability steps must be coded and documented to ensure the identification of a product in every phase of bovine meat production system.

In the European Union, great value is placed on accurate and safe animal identification. Usually, ear tags are used for maintaining the identity of individual animals. After slaughter, marks such as bar codes or alphanumeric codes, have to be placed on meat packages to guarantee the traceability (Reg. EC 1760/2000). Nevertheless, this method of "conventional traceability" is subjected to a substantial risk of accidental mislabelling at certain points of the chain production. In this respect, the DNA identification technology offers a powerful mean to authentify and control these conventional animal identification systems. The genetic identification is made possible by using a lot of molecular markers such as AFLP (amplified fragment length polymorphism), RFLP (restriction fragment length polymorphism), VNTR (variable number tandem repeat) and SNPs (single nucleotide polymorphism). These methods differ in genetic information, in standardisation of protocols, in the interpretation of results and in equipments that are required.

SNPs represent one of the more interesting approach in animal identification because they are abundant in the genome, genetically stable and amenable to high-throughput automated analysis (Syvänen 2001; Vignal *et al.*, 2002). Up to now, 69 highly informative bovine SNPs markers have been described (Heaton *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2004) and recently an innovative method in Real Time PCR have been setted for the discrimination of the SNPs tested on different breeds among which Chianina and Marchigiana (Capoferri *et al.*, 2004). The aim of this work was to verify the labelling systems of bovine meat, by sampling and controlling the chain production in different moments (farm, slaughter and point of sale).

## **MATERIALS AND METHODS**

The system setted in Spallanzani Institute for the traceability of livestock and meat, based on the joined use of tag identification (ordinary traceability) and SNPs markers (genetic traceability) is explained in the following steps.

*Samples collection.* In different farms, in association with the Consorzio Carne Bovina Documentata, hair samples were taken from 2000 animals registered in the National Bank Database. The samples were sent to the Genetic Laboratory to be stored and all the information related to the donors were deposited in a database. 188 meat samples were collected randomly at slaughter and 188 directly at the point of sale. The analyzed breeds were: Italian frisian (122), Half-breed (33), Charolais (21), Black Pied (9), Limousine (1), Blonde Aquitaine (1) and Auberac (1). The samples were sent to the Genetic Laboratory marked with a bar-code or with an identification number.

*DNA Analysis.* Genomic DNA of meat was isolated from 10 mg of tissue using a semi-automated nucleic acid platform (ABI PRISM 6100 Nucleic Acid Prepstation) and the relative Nuc Prep genomic DNA chemistry. Genomic DNA of hairs, was isolated from 10-15 hair roots using a PrepMan Ultra Solution (Applied Biosystems). The locus targeted, the primers and probes used for the amplification of bovine genomic DNA are listed in table 1. Allelic discrimination assay is substained by a TaqMan chemistry which permits the detection of a specific PCR product by means of a fluorogenic probe accumulated during the PCR process. This probe is labelled with a fluorescent dye and if target sequence is present, it anneals between primer sites and is cleaved by the 5' nuclease activity of a taq polymerase during the extension. Labelling two probes (one for each mutation) with two different fluorescent dyes makes it possible to

discriminate simultaneously the presence or absence of the mutations (Sequence Detection Systems ABI Prism 7900HT Chemistry Guide, Applied Biosystems). The amplification reaction contained 1-25 ng of genomic DNA, 6.25 µl of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 0.3 µl of 20x SNP Genotyping Assay Mix (specific for each polymorphism). The amplification was carried out in a thermal cycler (Sequence Detection System ABI Prism 7900HT, Applied Biosystems). The conditions of times and temperatures consisted of two initial steps; the first was performed at 50°C for 2 min (AmpErase UNG Activation) and the second at 95°C for 10 min (Amplitaq Gold DNA Polymerase Activation) followed by a cycle repeated 40 times. This cycle consisted of one melt at 92°C for 15sec and one anneal-extension at 60°C for 1 min. During the PCR the fluorogenic annealed probe was cleaved with a subsequent emission of fluorescence. At the end of the amplification we obtained, for each sample, different values (Rn) of fluorescence intensity. The genotyping was done using endpoint fluorescence measurements, defined as ΔRn: substantial increase in WT probe or MUT probe fluorescence indicated homozygosity for WT or MUT specific allele, while an increase in both signals indicated heterozygosity (fig.1). Genetic data were utilized for the statistical analysis. In the specific, the genotype frequencies of each SNP were calculated.

*Genotypes Comparison.* The conventional traceability was confirmed to compare genotype hairs (reference sample) and genotype meat (query sample).

## RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained in the form of genotype frequencies are reported in table 2. The probability, calculated on observed frequencies, that two randomly chosen individuals in the population of interest had an identical genotype was  $1 \times 10^{-4}$ . Among the 188 analyzed subjects, 2 have elicited an identical profile for the SNPs panel utilized, despite they were not related. The comparison between the 188 genotypes of the reference DNA and the genotypes of the analyzed samples has been shown to be correct for 181 subjects.

## CONCLUSIONS

In summary, this work demonstrates a high level of reliability of the ordinary traceability as confirmed by the 96% of correct results obtained.

The systematic sampling of young animals and the storage of samples provide a very powerful control tool. Genetic analysis permit to certify all the information printed on a label in conformity with EC 1760/2000.

The genetic control of products pathway (from the farm to the point of sale) guarantees the safety of food and the valorization of typical and certificated products.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank dr. Barreca, dr. Miotti, dr. Mondadori from the Consorzio Carne Bovina Documentata of Mantova and INDAL slaughterhouse for supplying us the samples used in this study.

This work was supported by funds from Regione Lombardia.