

MANUALE DI LABORATORIO
PER L'ANALISI DI OGM
IN MATRICI AGROALIMENTARI

MANUALE DI LABORATORIO PER L'ANALISI DI OGM
IN MATRICI AGROALIMENTARI

A cura di Lucia Martinelli, Eugenio Benvenuto, Lorenza Dalla Costa, Chiara Nobili

2007 ENEA
Ente per le Nuove tecnologie
l'Energia e l'Ambiente

Lungotevere Thaon di Revel, 76
00196 Roma

ISBN 88-8286-192-9



MANUALE DI LABORATORIO
PER L'ANALISI DI OGM
IN MATRICI AGROALIMENTARI

A CURA DI
LUCIA MARTINELLI, EUGENIO BENVENUTO,
LORENZA DALLA COSTA, CHIARA NOBILI

Il manuale è stato realizzato nell'ambito del PROGETTO *OSSERVA3* “*Rintracciabilità degli organismi geneticamente modificati nella filiera agroalimentare*”, finanziato con il Fondo Unico per la Ricerca della Provincia Autonoma di Trento, in base alla Legge Provinciale n. 3/2000, coordinatore scientifico Lucia Martinelli, IASMA

PREFAZIONE

Lo sviluppo di nuove tecnologie sempre più adatte a migliorare la produzione di prodotti agroalimentari è un processo di modernizzazione non lineare, in quanto “modernità” significa in primo luogo “cambiamento”: di status, di abitudini, di prospettive. Non sempre il cambiamento risulta accettabile agli occhi della Società che ne è protagonista, poiché il “passaggio di stato” può sollevare interrogativi e dubbi che valicano il dato scientifico per indagare sul senso che l'innovazione è chiamata a perseguire o su quale potere di fatto sarebbe legittimato a determinarne i fini. In una Società che richiede di non subire il trasferimento tecnologico ma di esserne partecipe, la gestione dell'innovazione deve necessariamente fondarsi su un insieme complesso di valutazioni tecniche e non-tecniche. Solo in questo modo sembra possibile tenere in adeguata considerazione le innumerevoli implicazioni che sono associate al trasferimento tecnologico.

Nel caso delle agro-biotecnologie, il diritto alla sicurezza alimentare espresso dai cittadini è sancito attraverso l'adozione formale di alcuni principi fondamentali espressi dal libro Bianco dell'Unione Europea sulla sicurezza alimentare: l'affermazione del carattere integrato della filiera alimentare; l'analisi del rischio quale fondamento essenziale della politica di sicurezza alimentare; la separazione netta delle fasi di analisi e gestione dei rischi; la responsabilità degli operatori del settore; la determinazione della tracciabilità dei prodotti in tutte le fasi della filiera alimentare; il diritto dei cittadini ad informazioni chiare e precise.

L'Istituto Agrario di San Michele all'Adige, cogliendo l'essenza di queste fondamentali direttrici, ha costituito, nell'ambito del progetto “OSSERVA3” finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento, Fondo per la Ricerca, il primo laboratorio di riferimento sul territorio trentino per la rintracciabilità degli organismi geneticamente modificati (OGM) nella filiera agroalimentare. Qui è svolta un'attività di ricerca che, accompagnata da una dinamica interazione con altri istituti a livello nazionale e internazionale, ha prodotto già alcuni risultati di ricerca innovativi.

In più, l'attività laboratoriale ha preso in considerazione la realtà territoriale, con l'ambizione di offrire un supporto concreto alla sicurezza alimentare ma anche di rispondere adeguatamente alle esigenze espresse dalla cittadinanza, incontrando la Società in cui la scienza si inserisce, dialogando con i suoi attori. Al fine di incentivare le sinergie ed armonizzare le differenze, un team di ricerca composto da professionisti delle scienze sociali, giuridiche, informatiche e della comunicazione ha affiancato le competenze di laboratorio, collaborando nei diversi settori cruciali per la sicurezza alimentare e garantendo costante interscambio metodologico e approccio fortemente interdisciplinare.

In quest'ambito, l'attenzione agli aspetti della formazione e della divulgazione rappresentano due momenti importanti, come prova questo manuale, che vuole offrirsi come semplice strumento per gli interessati all'analisi della rintracciabilità degli organismi geneticamente modificati nella filiera agroalimentare. Esso è stato pensato per chi abbisogni di una guida pratica per avvicinarsi a tali questioni nell'ambito della propria professione o per chi necessita di una base di lavoro per formare personale specializzato nel settore.

Istituto Agrario di San Michele all'Adige
Il Presidente
Giovanni Gius

INDICE

INTRODUZIONE	9
<i>Lucia Martinelli</i>	
CAPITOLO 1	11
PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE	
<i>Eugenio Benvenuto, Lucia Martinelli</i>	
CAPITOLO 2	17
LEGISLAZIONE SUGLI OGM NEL TERRITORIO EUROPEO	
<i>Lorenza Dalla Costa, Erica Candioli, Chiara Nobili, Lucia Martinelli</i>	
CAPITOLO 3	29
L'ETICHETTATURA QUALE RISPOSTA ALLA RICHIESTA INFORMATIVA DEL CONSUMATORE	
<i>Floriana Marin</i>	
CAPITOLO 4	37
CAMPIONAMENTO	
<i>Chiara Nobili, Lorenza Dalla Costa</i>	
CAPITOLO 5	43
ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA	
<i>Chiara Nobili, Lorenza Dalla Costa</i>	
CAPITOLO 6	49
TECNICHE ANALITICHE PER LA RINTRACCIABILITÀ DI OGM	
<i>Lorenza Dalla Costa, Chiara Nobili</i>	
CAPITOLO 7	51
ANALISI QUANTITATIVA: REAL-TIME PCR	
<i>Lorenza Dalla Costa, Chiara Nobili, Lucia Martinelli</i>	

CAPITOLO 8	69
ESERCITAZIONE PRATICA: ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA SU MANGIMI	
<i>Lorenza Dalla Costa, Chiara Nobili, Lucia Martinelli</i>	
CAPITOLO 9	97
BIBLIOGRAFIA	
<i>Chiara Nobili, Lorenza Dalla Costa</i>	
CAPITOLO 10	109
RASSEGNA SITI WEB DI RIFERIMENTO	
<i>Chiara Nobili</i>	
ALCUNE NOTE SUGLI AUTORI	113

INTRODUZIONE

Lucia Martinelli

L'organizzazione delle competenze di laboratorio e la definizione dei protocolli di indagine e delle linee di ricerca e sperimentazione che riguardano la rintracciabilità degli Organismi Geneticamente Modificati (OGM) nella filiera agroalimentare è un campo articolato e complesso. Nella nostra esperienza, la realizzazione di un laboratorio competente in questo settore richiede un notevole impegno, in particolare laddove sono richieste analisi validate e particolarmente credibili. Le tecniche su cui si basa questa analisi, riguardano aspetti che intrecciano la biologia molecolare, la chimica analitica, la statistica e la normazione. Inoltre, il confronto tra le differenti realtà laboratoriali si presenta spesso variegato e a volte contraddittorio nei suoi approcci per quanto concerne l'organizzazione dei laboratori, della definizione dei protocolli di analisi e dell'elaborazione dei dati.

La presente pubblicazione riporta una sintesi dell'esperienza da noi realizzata in alcuni anni di attività in quest'ambito, in cui ci siamo anche confrontati con una significativa casistica di laboratori del settore. Essa intende essere un manuale di semplice consultazione offerto a chi intende avvicinarsi agli aspetti analitici della rintracciabilità degli OGM, per esigenza di conoscere questo settore, per intraprendere la costituzione di un laboratorio o per formare personale specializzato.

Per questo, il libretto è strutturato come un manuale pratico che tratta gli argomenti teorici essenziali della materia, sintetizza i protocolli più rilevanti e fornisce una scelta bibliografica di approfondimento. Inoltre, è stato inserito un capitolo (Capitolo 8) che, nel riportare l'esempio concreto di un'esperienza analitica specifica, vuole cimentare chi legge in un'esercitazione a verifica della parte teorica.

Il manuale è stato realizzato nell'ambito del progetto "Rintracciabilità degli Organismi Geneticamente Modificati nella filiera agroalimentare" (OSSERVA3) finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento, Fondo per la Ricerca, coordinato dall'Istituto Agrario di San Michele all'Adige (IASMA, Lucia Martinelli), cui hanno partecipato anche l'Agenzia per la Garanzia della Qualità in Agricoltura (AQA, Gian

Antonio Battistel) con sede a San Michele all'Adige, l'ENEA di Roma (ENEA-CR Casaccia, Roma, Eugenio Benvenuto) e l'Istituto per la Ricerca Scientifica e Tecnologica (ITC-irst, Povo di Trento, Paolo Bresciani).

Il progetto ha consentito la costituzione di un nucleo integrato di persone competenti a largo spettro sulle problematiche OGM, essendo caratterizzato da una trasversalità multidisciplinare in cui si sono integrate competenze di varia estrazione, afferenti alle scienze biologiche, sociologiche, informatiche e dell'organizzazione, cui si sono affiancati aspetti di comunicazione e formazione. Accanto alla costituzione sul territorio di expertise prima non presenti, quali le realtà laboratoriali – sia direttamente in IASMA sia di giovani realtà imprenditoriali – adeguate ad affrontare la tematica della rintracciabilità degli OGM, sono cresciute anche competenze nei molteplici settori collegati a questa problematica che investono ambiti che travalicano la pura pratica laboratoriale.

Ringraziamo le istituzioni, i colleghi ed i collaboratori che hanno reso possibile la crescita in un settore molto stimolante e tutti i vari attori del territorio, operatori del settore e cittadini, che ci hanno accompagnato in questa interessante esperienza.

Lucia Martinelli

Responsabile scientifico Progetto OSSERVA3

CAPITOLO 1

PIANTE GENETICAMENTE MODIFICATE

Eugenio Benvenuto, Lucia Martinelli

Secondo la legge (Reg. CE 1830/2003)¹, un Organismo Geneticamente Modificato (OGM) è “...un organismo diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale...”.

Gli OGM sono dunque quegli organismi in cui sono stati trasferiti geni con tecniche di laboratorio, secondo modalità differenti da quanto avviene con l'incrocio, sia in natura, sia con la pratica agricola tradizionale, basata sul *breeding*. La definizione “giuridica” di OGM, perciò, sottolinea la modalità tecnica con cui questi organismi sono prodotti nei laboratori.

Oggi, nella ricerca, il trasferimento di geni nelle piante è uno strumento fondamentale per lo studio e la comprensione di aspetti cruciali della biologia vegetale; in piante modello, infatti, lo sviluppo congiunto delle tecniche molecolari e delle colture *in vitro* sta portando ad una svolta risolutiva negli studi di “scoperta” di geni e di genomica funzionale.

Per quanto riguarda il trasferimento tecnologico, da poco più di un decennio sono state rilasciate in campo piante prodotte con il trasferimento di geni esogeni e, negli ultimi anni, queste si sono diffuse sul mercato a livello mondiale. La maggior parte delle piante GM oggi coltivate (principalmente soia, mais, cotone, colza) sono state sviluppate per due scopi: ottenere resistenza a malattie o insetti e ottenere tolleranza ad erbicidi selettivi. Queste piante, essendo quelle attualmente impiegate nel settore agroalimentare, sono oggetto delle analisi per la rintracciabilità. Per questo, saranno prese in considerazione nei successivi capitoli, nelle sezioni appropriate che le trattano a livello legislativo (Capitolo 2, Tabelle 1 e 2), geografico (Capitolo 3, Figura 1) e analitico (Capitolo 8, Figure 9-13). Ulteriori approfondimenti saranno suggeriti, inoltre, nei capitoli dedicati alla bibliografia (Capitolo 9) e ai siti web (Capitolo 10).

¹ Regolamento CE 1830/2003 del 22 settembre 2003, GUCE L 268 del 18/10/2003, pag. 24

Vogliamo qui, invece focalizzare un settore di rilievo della ricerca che riguarda la produzione di piante esprimenti geni esogeni. Alcune applicazioni di colture GM di “nuova generazione”, infatti, puntano a migliorare aspetti nutritivi negli alimenti o alla produzione di biofarmaceutici utilizzando piante geneticamente modificate.

Alla cosiddetta “seconda generazione” appartengono quegli alimenti conosciuti anche come “nutraceutici”, cioè produzioni modificate con particolari caratteristiche aggiuntive, con benefici che vanno al di là dei tradizionali nutrienti di quel prodotto. Un esempio di questo tipo è quello dell’ingegneria metabolica delle vie biosintetiche che portano all’accumulo di vitamine. Significativo esempio è il caso del “*Golden Rice*”, una varietà transgenica di riso arricchita del precursore della vitamina A (Beyer *et al.*, 2002). Alimento fondamentale per più di un terzo della attuale popolazione mondiale, il riso è però carente di molti nutrienti essenziali. L’utilizzo, dunque, di questo riso nelle diete di paesi dove la carenza di questa vitamina porta, in casi gravi, a cecità e a morte nei primi anni di vita, potrebbe rappresentare un veicolo opportuno per distribuire la vitamina necessaria.

Alla “nuova generazione” di piante GM appartengono anche piante transgeniche studiate per produrre molecole ad alto valore aggiunto che oggi derivano da sintesi di diverso tipo (biologica e/o chimica). Da queste piante è possibile ottenere veri e propri farmaci (Ma *et al.*, 1997; Walmsley *et al.*, 2003). Pertanto la loro introduzione è assimilabile a quella che caratterizza la ricerca, la regolamentazione, la produzione e la commercializzazione di qualsiasi altro tipo di farmaco.

Nel campo dei vaccini, per esempio, la possibilità di ottenere in pianta formulati vaccinali diventa particolarmente interessante perché questi possono essere conservati e distribuiti sotto forma di semi, tuberi o frutti, semplificando notevolmente i programmi di immunizzazione. In alcuni casi particolari (vaccini di interesse veterinario) è anche possibile immaginare di somministrare i prodotti per ingestione di parti edibili della pianta, senza ricorrere a laboriose procedure estrattive (Mason *et al.*, 2002).

Piante migliorate al fine di ottimizzare i livelli di espressione di composti di interesse (sia naturali che ricombinanti) rappresentano, inoltre, un sistema di produzione su larga scala più semplice ed economico rispetto alla sintesi chimica o ai fermentatori di batteri, lieviti, cellule animali.

Un ulteriore aspetto di estremo interesse, in quest'ambito, riguarda la possibilità di rendere le piante in grado di produrre anticorpi destinati a diagnosi o terapia, con rese e qualità superiori all'espressione basata su altri sistemi eterologhi (Ma *et al.*, 2005). Piante GM per la produzione di vaccini sono già state realizzate seguendo diversi tipi di metodologie, ed alcune di esse, dopo aver superato i test sperimentali sugli animali da laboratorio, sono attualmente impiegate per test clinici su volontari umani. In particolare, si sta valutando l'efficacia, nell'indurre una risposta immunitaria protettiva, di piante di patata capaci di produrre un vaccino contro l'epatite B e contro l'enterotossina di *E.coli*, che causa dissenterie molto gravi (Richter *et al.*, 2000), o di piante di spinacio che codificano per una proteina-vaccino contro il virus della rabbia.

Anche nell'applicazione delle piante per la produzione su larga scala di anticorpi ricombinanti, a scopo diagnostico o terapeutico, ormai molti sono gli esempi riportati dalla letteratura internazionale, fra cui, solo per citarne alcuni, una immunoglobulina complessa, espressa in piante di tabacco, in grado di arrestare l'attività dello *Streptococcus mutans*, il principale responsabile della carie dentaria o un anticorpo, espresso in piante di soia, contro l' Herpes Simplex Virus (Fischer *et al.*, 2003).

Sempre nel campo dei biofarmaceutici si sta valutando la possibilità di produrre anche proteine per la realizzazione di vaccini contro varie forme di allergia, dalla comune febbre da fieno e asma allergica, particolarmente diffuse nei paesi industrializzati, alla ben più grave celiachia.

In tutti questi casi va sottolineato il grosso vantaggio, in termini di risparmio di risorse economiche e tempo, che le piante "bio-fabbrica" potrebbero offrire, consentendo anche la produzione *in loco* o semplicemente il trasporto del vaccino sotto forma di semi e/o frutti.

Alla luce di quanto descritto, appare chiaro che le biotecnologie vegetali rappresentano un settore in rapida evoluzione non esclusivamente confinato alla realizzazione di piante dalle migliorate *performance* agronomiche, pertanto è un campo in forte espansione e sarebbe un errore considerarle un settore residuale.

Vogliamo infine sottolineare che con l'aiuto delle scoperte derivate dall'era post-genomica, le piante di nuova generazione saranno frutto delle conoscenze dei fenomeni di base che regolano lo sviluppo dei viventi e dell'utilizzo su base razionale di caratteristiche che rispondono a esigenze di un'agricoltura diversificata.

Recentemente è stato discusso sulla coesistenza tra colture tradizionali, biologiche e geneticamente modificate nel rispetto delle normative sulle piante GM (Consensus Document, 2006). Nota chiave di questo documento è l'attenzione che deve essere esercitata sulla gestione della commistione accidentale tra colture GM e non, dovuta alla presenza di impurezze nelle sementi, all'impollinazione incrociata, a piante spontanee (provenienti soprattutto da precedenti colturali), o anche da pratiche seguite per la raccolta, lo stoccaggio e il trasporto e delle conseguenze economiche che ne possono derivare. Recenti studi evidenziano che è possibile tale coesistenza rispettando i criteri indicati dalla Raccomandazione Europea 556/2003²: trasparenza, scientificità, proporzionalità e specificità e promuovendo azioni di monitoraggio e gestione delle pratiche di coesistenza adottate (Consensus Document, 2006).

Ci sembra interessante qui ricordare, infine, anche un aspetto di rilievo che riguarda la ricerca relativa al perfezionamento delle tecniche per il trasferimento dei geni endogeni nelle piante. La recente attenzione al rispetto dell'ambiente e alla riduzione dei rischi biologici, conseguente anche alla volontà di instaurare un dialogo rispettoso e costruttivo con la società da parte di alcuni ricercatori, ha prodotto una linea di ricerca che rappresenta una svolta significativa nelle biotecnologie vegetali: la messa a punto e l'impiego di costrutti diversi da quelli tradizionali per trasferire i geni nelle piante (Bailey & Kaepler, 2001). Infatti, il problema dei geni marcatori – da associare al gene di interesse da inserire – è un aspetto cruciale di tutta la strategia, poiché consente di discriminare i tessuti che hanno inserito il gene esogeno da quelli che non lo hanno assunto. Generalmente sono impiegati, come marcatori, geni per la resistenza ad antibiotici: questo punto è uno degli aspetti più controversi e meno accettati dall'opinione pubblica, tanto che a breve essi saranno banditi (Direttiva 2001/18/CE).³

² Raccomandazione 2003/556/CE, GUCE L 189 del 29/7/2003, pag. 36

³ Direttiva 2001/18/CE del 12 marzo 2001, GUCE C 304 E del 30/10/2001, pag. 221

I nuovi costrutti sono stati ideati per trasferire ai tessuti vegetali geni marcatori a basso impatto ambientale (Holmberg *et al.*, 1997; Haldrup *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 2001) o addirittura solamente il gene di interesse eliminando il marcatore, mediante cotrasformazione (Komari *et al.*, 1996; Daley *et al.*, 1998), elementi transponibili (Goldsburg *et al.*, 1993), ricombinazione sito specifica (Sugita *et al.*, 1999; Iamtham & Day, 2000; Zubko *et al.*, 2000; Ebinuma & Komamine, 2001; Zuo *et al.*, 2001). Per sottolineare la loro caratteristica di maggior rispetto della costituzione “naturale” della pianta in cui inserire i geni, questi costrutti vengono definiti in vari modi, quali “eco-compatibili”, “eco-sostenibili”, “puliti”.

In conclusione, accanto agli aspetti puramente scientifici, per quanto riguarda l’impiego della tecnologia basata sul trasferimento genico per la produzione di piante geneticamente migliorate, la comunità scientifica ritiene che, curando gli aspetti di una corretta valutazione e gestione del rischio, evidenziando i vantaggi per il consumatore, valutando puntualmente il rapporto rischio/beneficio (biosicurezza) e perseguendo politiche di condivisione del trasferimento tecnologico, a partire dallo studio di piante GM si potrebbe trovare lo spunto per mettere a fuoco approcci metodologici innovativi e per l’approfondimento della conoscenza degli aspetti biologici e molecolari, che sono considerati strumenti necessari per l’affermazione delle biotecnologie avanzate.

CAPITOLO 2

LEGISLAZIONE SUGLI OGM NEL TERRITORIO EUROPEO

Lorenza Dalla Costa, Erica Candioli, Chiara Nobili, Lucia Martinelli

LEGISLAZIONE COMUNITARIA VIGENTE

I Regolamenti CE n. 1829/2003 e n. 1830/2003, entrati in vigore in Europa rispettivamente il 19 e il 15 aprile 2004, costituiscono gli atti fondamentali su cui si basa l'attuale legislazione comunitaria in materia di OGM.

Il Regolamento CE 1829/2003¹, relativo agli alimenti e, per la prima volta, ai mangimi geneticamente modificati, definisce in dettaglio la procedura comunitaria per ottenere l'autorizzazione di nuovi OGM e di alimenti e mangimi che contengono, sono costituiti o sono prodotti a partire da OGM. Va osservato come questo Regolamento non si applichi a prodotti alimentari o mangimi ottenuti con OGM, ove cioè un OGM è utilizzato durante il processo di lavorazione, ma che non rimane nel prodotto finale (ad esempio coadiuvanti tecnologici, come enzimi ottenuti con procedimenti biotecnologici).

Autorizzazione

La procedure per richiedere l'autorizzazione al commercio di OGM per l'impiego nell'alimentazione umana sono descritte negli articoli 5, 6 e 7, per l'impiego nell'alimentazione animale negli articoli 17, 18 e 19. In sintesi, il richiedente deve inoltrare all'Autorità competente dello Stato membro una domanda di autorizzazione all'immissione in commercio per ciascun OGM e i suoi possibili utilizzi ad uso umano o animale, corredata da una notevole e dettagliata documentazione, comprensiva del metodo analitico di rilevazione, del metodo di campionamento, unitamente alla fornitura di campioni di controllo. Lo Stato membro trasmette la domanda all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), che procede all'analisi scientifica del rischio in riferimento agli effetti sull'ambiente, sulla salute umana ed animale.

¹ Regolamento CE 1829/2003 del 18 ottobre 2003, GUCE L 268 del 18/10/2003, pag. 1

Il parere scientifico dell'EFSA viene inoltrato alla Commissione Europea e agli Stati membri; in questa fase anche il pubblico può presentare osservazioni alla Commissione. Sulla base di questi dati, la Commissione stessa può approvare o meno l'autorizzazione.

La validazione del metodo di rilevazione viene effettuata dal Laboratorio Comunitario di Riferimento (CRL), che ha sede presso il Joint Research Centre della Commissione Europea. Gli OGM, una volta superata la procedura di autorizzazione, vengono inseriti nel "Registro Comunitario degli alimenti e dei mangimi geneticamente modificati": al momento attuale sono autorizzati all'immissione in commercio diversi OGM (Tabella 1) e molti altri sono ancora in fase di valutazione scientifica e di autorizzazione (Tabella 2).

L'autorizzazione avrà una validità pari a 10 anni su tutta l'Europa e sarà rinnovabile per periodi decennali. Inoltre, l'iscrizione dell'alimento o del mangime autorizzato nel registro comunitario degli alimenti e dei mangimi geneticamente modificati e accessibile al pubblico per una maggiore trasparenza. Il registro comunitario contiene informazioni sul prodotto quali il nome dell'ente che detiene l'autorizzazione, l'esatto scopo dell'autorizzazione, la descrizione completa del prodotto, dettagli sulla valutazione del rischio e la data dell'immissione in commercio sul territorio europeo. Per quanto riguarda gli OGM destinati all'alimentazione animale (mangimi), il Regolamento riporta una procedura di autorizzazione analoga; tuttavia, se è previsto che il prodotto venga utilizzato sia come alimento che come mangime, è sufficiente che sia presentata una richiesta unica.

Etichettatura

Una delle sezioni più significative del suddetto Regolamento è relativa all'obbligo di etichettatura degli OGM autorizzati all'immissione in commercio – gli OGM non autorizzati sono, di fatto, illegali – al di sopra dello 0,9% rispetto al singolo ingrediente alimentare o al singolo componente di un mangime. Tale obbligo non sussiste a percentuali di OGM < 0,9% purché la presenza di OGM sia accidentale o tecnicamente inevitabile (gli operatori devono dimostrare di avere adottato tutte le misure appropriate per evitarne la presenza).

Un altro aspetto importante riguarda gli OGM non ancora autorizzati, per cui il Regolamento stabilisce una soglia di tolleranza dello 0,5% purché la loro presenza sia accidentale o tecnicamente inevitabile.

Altri requisiti necessari affinché questa tolleranza venga applicata prevedono che l'OGM non autorizzato in questione debba aver ricevuto parere favorevole dal comitato scientifico competente o dell'Autorità per la sicurezza alimentare, che la relativa domanda di autorizzazione non sia stata respinta e che i relativi metodi di rilevazione siano resi pubblici. Questo provvedimento ha un periodo di validità transitoria pari a tre anni, sino al 19 aprile 2007.

Il Regolamento inoltre specifica dettagliatamente i requisiti dell'etichettatura di un prodotto che contiene, è costituito o prodotto a partire da un OGM, prevedendo delle precise diciture, come “geneticamente modificato” o “prodotto a partire da (nome dell'organismo) geneticamente modificato” oppure “contiene (nome dell'ingrediente) prodotto a partire da (nome dell'organismo) geneticamente modificato”.

Queste informazioni devono apparire nell'elenco degli ingredienti, oppure, se non è prevista una lista degli ingredienti, essere comunque ben visibili sull'etichetta.

Se l'alimento è messo in vendita sfuso o in piccoli contenitori preimballati, l'informazione deve essere evidente accanto o sull'espositore dell'alimento o sul materiale d'imballaggio. Se si tratta di prodotti, anche in grandi quantità, non confezionati, e se l'utilizzazione di un'etichetta è impossibile, l'operatore deve fare in modo che tali informazioni siano trasmesse unitamente al prodotto. Esse possono configurarsi, ad esempio, quali documenti d'accompagnamento.

Con questo Regolamento vengono abrogati i regolamenti precedenti (Reg. CE n. 1139/98; Reg. CE n. 49/2000; Reg. CE n. 50/2000) e viene modificato il Reg. CE n. 258/97² che prevedeva procedure semplificate basate sulla sola notifica per alcuni prodotti e ingredienti alimentari contenenti, costituiti o prodotti a partire da OGM.

Il Regolamento CE n. 1830/2003³ relativo alla tracciabilità e all'etichettatura di OGM ed alla tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da OGM, sancisce che gli

² Regolamento CE 258/1997 del 27 gennaio 1997, GUCE L 43 del 14/2/1997, pag. 1

³ Regolamento CE 1830/2003 del 22 settembre 2003, GUCE L 268 del 18/10/2003, pag. 24

OGM e i prodotti ottenuti da OGM devono poter essere rintracciati lungo tutte le fasi dell'immissione in commercio attraverso la catena di produzione e di distribuzione.

In particolare, il Regolamento definisce i principi per la rintracciabilità degli OGM principalmente attraverso l'obbligo da parte degli operatori di trasmettere e conservare le informazioni più importanti relative a tali prodotti, in tutte le fasi della loro immissione in commercio.

Tale misura ha due obiettivi principali: da un lato, informare i consumatori grazie all'etichettatura obbligatoria di questo tipo di prodotti, dall'altro creare una «rete di sicurezza» grazie alla possibilità di ricostruire la “storia” di tali prodotti attraverso tutte le fasi della produzione, della fabbricazione e della commercializzazione. Questa «rete di sicurezza» permette la verifica della correttezza delle diciture espresse in etichetta, la sorveglianza mirata degli effetti potenziali per la salute umana o per l'ambiente e l'eventuale ritiro dei prodotti qualora si constati un rischio inatteso per la salute umana o l'ambiente.

Il Regolamento CE n. 1830/2003 armonizza e completa le misure in materia di tracciabilità già esistenti nella Direttiva 2001/18/CE⁴ sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati, recepita in Italia con il Decreto Legislativo (DLgs) n. 224 dell'8 luglio 2003⁵.

Per garantire la rintracciabilità, è necessario che l'identità del singolo OGM sia stabilita fin dalla prima fase della sua immissione in commercio; gli operatori sono perciò tenuti a includere assieme al prodotto, oltre l'indicazione esplicita che il prodotto contiene o è costituito da OGM, l'indicazione del codice esclusivo di identificazione dell'OGM (o degli OGM) contenuto nel prodotto. Questi “Identificatori Unici”⁶ sono codici alfanumerici, definiti dall'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo sviluppo economico), che includono informazioni relative al richiedente/titolare dell'autorizzazione e all'evento di trasformazione.

⁴ Direttiva 2001/18/CE del 12 marzo 2001, GUCE C 304 E del 30/10/2001, pag. 221

⁵ DLgs n. 224 dell'8 luglio 2003, GURI n. 194 del 22/8/2003 Suppl. ord. n. 138

⁶ Regolamento CE n. 65/2004 del 14 gennaio 2004, GUCE L10 del 16/01/2004, pag. 5

Coesistenza

La Commissione Europea ha affrontato recentemente la questione relativa alla coesistenza delle colture convenzionali, biologiche e geneticamente modificate.

L'utilizzo di OGM autorizzati alla semina (ossia iscritti nei Registri nazionali delle varietà o nel Registro comunitario delle varietà) infatti, pone il problema di gestire la presenza accidentale di prodotti agricoli transgenici, dovuta per esempio a impollinazione incrociata, o alle pratiche eseguite dopo la raccolta, durante trasporti o lavorazioni. Secondo la Commissione, gli agricoltori dovrebbero poter scegliere quale tipo di coltura praticare, se tradizionale, biologica o transgenica.

La Commissione ha espresso questi principi in un documento (Raccomandazione della Commissione del 23 luglio 2003 recante orientamenti per lo sviluppo di strategie nazionali e migliori pratiche per garantire la coesistenza tra colture transgeniche, convenzionali e biologiche)⁷ che precisa le linee guida per l'elaborazione da parte degli Stati membri di strategie nazionali che consentano la coesistenza di colture geneticamente modificate con colture tradizionali e dell'agricoltura biologica. Nella Raccomandazione sono elencati principi da considerare nello sviluppo degli approcci nazionali e una serie di misure tecniche (ad esempio: distanze di separazione, barriere per il polline, scelta di colture con diversi periodi di fioritura, monitoraggio).

Al momento attuale gli Stati membri e la Commissione Europea sono al centro di un difficoltoso dibattito in merito all'adeguatezza delle proposte fatte a livello delle varie Nazioni; frequentemente infatti la Commissione stessa si è trovata a respingere leggi attuative della Raccomandazione sulla coesistenza o comunque sollevare obiezioni. In questa situazione si trova anche lo Stato italiano.

Ulteriori strumenti legislativi

Altri strumenti legislativi concernenti gli OGM sono:

- la Direttiva 90/219/CE del Consiglio, del 23 aprile 1990, sull'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati⁸;

⁷ Raccomandazione 2003/556/CE, GUCE L 189 del 29/7/2003, pag. 36

⁸ Direttiva 90/219/CE del Consiglio del 23 aprile 1990, GUCE L 117 dell' 8/5/1990, pag. 1

- il Regolamento CE n. 1946/2003, del 15 luglio 2003, sui movimenti transfrontalieri degli organismi geneticamente modificati⁹;
- il Regolamento CE n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2003, sugli additivi destinati all'alimentazione animale¹⁰;
- il Regolamento CE n. 65/2004 della Commissione, del 14 gennaio 2004, che stabilisce un sistema per la determinazione e l'assegnazione di identificatori unici per gli organismi geneticamente modificati⁶;
- il Regolamento CE 641/2004 della Commissione, del 6 aprile 2004¹¹, recante norme attuative del Regolamento CE 1829/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda la domanda di autorizzazione di nuovi alimenti e mangimi geneticamente modificati, la notifica di prodotti preesistenti e la presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di materiale geneticamente modificato che è stato oggetto di una valutazione del rischio favorevole;
- il Regolamento CE n. 882/2004, del 29 aprile 2004¹², sui controlli ufficiali per la verifica dell'adeguamento alla legislazione sugli alimenti e sui mangimi e alle regole per garantire la salute umana e animale.

Nelle seguenti tabelle sono elencati gli eventi OGM autorizzati dalla Commissione Europea all'immissione in commercio ed iscritti nel Registro Comunitario al 3 maggio 2006 (Tabella 1) e gli eventi OGM in fase di valutazione scientifica al 3 maggio 2006 (Tabella 2). Il procedimento autorizzativo istituito dal Reg. 1829/2003 prevede che l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare esegua la valutazione scientifica del rischio degli alimenti o mangimi geneticamente modificati. La Tabella 2 mostra l'avanzamento delle valutazioni.

⁹ Regolamento CE 1946/2003 del 15 luglio 2003, GUCE L 287 del 5/11/2003, pag. 1

¹⁰ Regolamento CE 1831/2003 del 22 settembre 2003, GU L 268 del 18/10/2003, pag. 29

¹¹ Regolamento CE 641/2004 del 6 aprile 2004, GUCE L 102 del 7/4/2004, pag. 14

¹² Regolamento CE 882/2004 del 29 aprile 2004, GUCE L 191 del 28/5/2004, pag. 1

Coltura	Evento di trasformazione genetica	Proprietà acquisita
Soia	MON 40-3-2 ⁽¹⁾	Soia tollerante all'erbicida glifosato
Mais	MON 863 ⁽¹⁾	Mais resistente agli insetti
	MON 810 ⁽¹⁾	Mais resistente agli insetti
	NK 603 ⁽¹⁾	Soia tollerante all'erbicida glifosato
	NK 603 X MON 810 ⁽¹⁾	Mais ibrido tollerante all'erbicida glifosato e a larve di lepidotteri
	DAS1507 ⁽³⁾	Soia tollerante all'erbicida glufosinato ammonio e insetti
	T25 ⁽²⁾	Soia tollerante all'erbicida glufosinato ammonio
	GA 21 ⁽¹⁾	Mais con aumentata tolleranza all'erbicida glifosato
	Bt 11 ⁽⁴⁾	Mais resistente agli insetti
	Bt176 ⁽⁴⁾	Mais resistente agli insetti (proprietà insetticida conferita dal gene per l'endotossina Bt) e con aumentata tolleranza all'erbicida glufosinato ammonio
	GA 21 X MON 810 ⁽¹⁾	Mais ibrido tollerante all'erbicida glifosato e a insetti
	MON863 X MON810 ⁽¹⁾	Mais ibrido resistente alla Diabrotica e ai lepidotteri
	MON863 X MON 603 ⁽¹⁾	Mais ibrido resistente alla Diabrotica e tollerante al glifosato
Colza	GT 73 ⁽¹⁾	Colza tollerante all'erbicida glifosato
	MS8, RF3, MS8 X RF3 ⁽²⁾	Colza ibrida tollerante all'erbicida glufosinato ammonio
	MS1, RF1, MS1 XRF1 ⁽²⁾	Colza ibrida tollerante all'erbicida glufosinato ammonio
	MS1, RF2,MS1 X RF2 ⁽²⁾	Colza ibrida tollerante all'erbicida glufosinato ammonio
	TOPAS 19/2 ⁽²⁾	Colza ibrida tollerante all'erbicida glufosinato ammonio
	T45 ⁽²⁾	Colza tollerante all'erbicida Liberty
Cotone	MON 1445 ⁽¹⁾	Cotone resistente all'erbicida glifosato
	MON 531 ⁽¹⁾	Cotone resistente agli insetti
	MON 531 X MON 1445 ⁽¹⁾	Cotone ibrido resistente all'erbicida glifosato e agli insetti
	MON15985 ⁽¹⁾	Cotone resistente agli insetti
	MON15985 X MON1445 ⁽¹⁾	Cotone ibrido resistente all'erbicida glifosato e agli insetti

Tabella 1 Eventi OGM autorizzati dalla Commissione Europea all'immissione in commercio ed iscritti nel Registro Comunitario al 3 maggio 2006

Note: ⁽¹⁾ Monsanto Services International, ⁽²⁾Bayer Cropscience, ⁽³⁾Pioneer Overseas Corporation, ⁽⁴⁾Syngenta Crop Protection.

Fonte: http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm

Evento/Specie	Scopo	Stato
Mais NK603 x MON810	Alimenti/mangimi	Pubblicato parere dell'EFSA
Mais 1507	Alimenti	Pubblicato parere dell'EFSA
Mais MON863 x MON810	Alimenti/mangimi	Pubblicato parere dell'EFSA
Riso LLRICE62	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	Domanda riconosciuta valida
Mais 1507 x NK603	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	Domanda riconosciuta valida Pubblicata la validazione del metodo
Mais MON863 x NK603	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	Pubblicato parere dell'EFSA
Mais MON863 x MON810 x NK603	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	Pubblicato parere dell'EFSA
Barbabietola da zucchero H7-1	Alimenti/mangimi (prodotti derivati da piante GM)	Domanda riconosciuta valida Pubblicata la validazione del metodo
Cotone MON 531 x MON 1445	Alimenti/mangimi (prodotti derivati da piante GM)	Domanda riconosciuta valida
Cotone MON 15985, MON 15985 x MON 1445	Alimenti/mangimi (prodotti derivati da piante GM)	Domanda riconosciuta valida
Mais MIR604	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	Domanda riconosciuta valida
Mais 59122	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	Domanda riconosciuta valida Pubblicata la validazione del metodo
Cotone LLCotton25	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	Domanda riconosciuta valida
Patata Amylopectin Potato EH92-527-1	Alimenti/mangimi	Pubblicato parere scientifico
Mais 1507 x 59122	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Cotone 281-24-236 x 3006-210-23	Alimenti/mangimi	Domanda riconosciuta valida
Mais 1507 x NK603	Alimenti/mangimi Importazione, lavorazione, coltivazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Soia A2704-12	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	Domanda riconosciuta valida
Mais GA21	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais 59122 x NK603	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais 59122 x 1507 x NK603	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais NK603	Alimenti/mangimi Importazione, lavorazione, coltivazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive) Pubblicata la validazione del metodo

Mais 59122	Alimenti/mangimi Importazione, lavorazione, coltivazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Soia 40-3-2	Alimenti/mangimi Importazione, lavorazione, coltivazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Colza T45	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais NK603 x MON810	Coltivazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais MON 88017	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais 1507 x 59122	Alimenti/mangimi Importazione, lavorazione, coltivazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais 59122 x NK603	Alimenti/mangimi Importazione, lavorazione, coltivazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais 59122 x 1507 x NK603	Alimenti/mangimi Importazione, lavorazione, coltivazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais LY038	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais LY038 x MON810	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais MON 88017 x MON 810	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)
Mais 3272	Alimenti/mangimi Importazione e lavorazione	In verifica (richieste informazioni aggiuntive)

Tabella 2 **Eventi OGM in fase di valutazione scientifica al 3 maggio 2006**

Fonte: http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gm_ff_applications/catindex_en.html

NORMATIVA VIGENTE NELLA PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO

Accanto all'opzione istituzionale comunitaria, alcune realtà del territorio italiano, aspirando a qualificare prodotti tipici locali, hanno adottato regole volontarie specifiche per il rilascio di contrassegni "non-OGM".

La provincia autonoma di Trento con Legge provinciale n. 4, del 28 marzo 2003¹³, "Sostegno dell'economia agricola, disciplina dell'agricoltura biologica e della contrassegnazione di prodotti geneticamente non modificati" ha introdotto la possibilità del "rilascio e dell'apposizione sui prodotti derivanti dalle produzioni agro-alimentari della provincia di Trento di un "contrassegno" attestante l'assenza di OGM".

¹³ L.P. 4 del 28 marzo 2003, BUR n. 15 suppl. n. 2 del 15/04/2003

Per godere di questa opportunità, l'azienda dovrà dimostrare, attraverso uno specifico piano di autocontrollo, l'assoluta assenza di OGM nel prodotto "contrassegnato" e/o nei mangimi utilizzati nell'alimentazione degli animali dai quali proviene la materia prima del prodotto "contrassegnato". Con il predetto piano, mediante specifici autocontrolli, l'azienda detentrica del "contrassegno" deve:

- garantire l'identificazione e la rintracciabilità delle materie prime;
- garantire che le sementi e le materie prime considerate a rischio utilizzate siano non OGM;
- evitare ogni possibile contaminazione ed in particolare l'impollinazione crociata;
- garantire il trasporto delle materie prime e dei prodotti in purezza;
- garantire che attrezzature e macchinari utilizzati siano privi di residui di prodotti OGM;
- evitare nei centri di deposito e magazzinaggio ogni possibile contaminazione;
- garantire che i mangimi utilizzati nell'alimentazione degli animali non contengano OGM, farine animali, ormoni e antibiotici;
- garantire il rispetto delle tecniche di alimentazione dettate dal Regolamento di esecuzione della precitata legge provinciale.

L'autorità competente avrà il compito di monitorare con una serie di controlli l'adempimento delle norme.

Il consumatore troverà sul prodotto della ditta aderente a questa iniziativa un "contrassegno" con un logo specifico, riportante le seguenti diciture: "*Non OGM*" oppure "*carne, yogurt ecc. da animali alimentati con mangimi geneticamente non modificati*".

Il Regolamento di esecuzione, e quindi l'operatività della legge per quanto riguarda la contrassegnazione delle produzioni geneticamente non modificate, entrerà in vigore entro la fine del mese di maggio 2006 e quindi da quella data le aziende interessate a questo tipo di "certificazione" potranno presentare domanda per l'ottenimento del "contrassegno".

I METODI NORMATI PER LE ANALISI DI LABORATORIO

Le norme volontarie

Le norme sono documenti tecnici, ad applicazione volontaria, che definiscono le caratteristiche di un prodotto, processo o servizio, in riferimento allo stato attuale delle conoscenze. Nel lavoro di normazione è previsto il contributo di tutte le parti interessate all'argomento, in modo da assicurare principi di democraticità e consensualità, allo scopo di garantire l'applicazione della norma stessa in tutti i punti della filiera e da chiunque.

Gli Enti che emanano le norme sono: a livello internazionale l'ISO (International Organization for Standardization), a livello europeo il CEN (European Committee for Standardization) e a livello nazionale l'UNI (Ente Nazionale Italiano di Unificazione).

Per quanto riguarda i metodi analitici per la ricerca degli OGM nelle matrici alimentari, il settore della normazione volontaria è intervenuto allo scopo di colmare una mancanza di documenti di riferimento ufficialmente riconosciuti a livello nazionale e internazionale.

Sono quindi stati costituiti a partire dal 1999 da parte degli Enti di Normazione una serie di gruppi di lavoro allo scopo di elaborare metodi analitici e di campionamento standardizzati, nel rispetto dello stato corrente delle conoscenze scientifiche. Il risultato analitico ottenuto da tali metodi di prova deve poter essere considerato oggettivamente, ufficialmente e universalmente valido, facilitando anche lo svolgimento delle transazioni commerciali.

Il gruppo di lavoro europeo CEN/TC 275/WG11 "GMO", il primo ad essere costituito, ha operato per mettere a punto norme tecniche sui metodi per la ricerca degli OGM, e ha portato alla predisposizione di vari documenti.

In questo contesto, la Commissione Alimenti e Bevande dell'UNI ha formato, a livello nazionale, il Gruppo di Lavoro GL 4 "Organismi Geneticamente Modificati negli Alimenti (GMO)" che ha attivamente contribuito all'elaborazione dei metodi.

In ambito internazionale, invece, opera dal 2000 un gruppo di lavoro ISO (ISO/TC 34/WG7 "GMO"), che è partito nella sua attività prendendo in considerazione il lavoro già svolto a livello CEN.

I documenti operativi elaborati e approvati consensualmente da tutti i gruppi di lavoro, sono giunti ormai alla fine dell'iter di normazione e riguardano i seguenti aspetti:

- l'analisi delle proteine (pubblicata nel marzo 2003)
EN ISO 21572:2003 Foodstuffs - Detection of genetically modified organisms and derived products - Protein based methods
- i requisiti generali e le definizioni (pubblicata nel gennaio 2006)
EN ISO 24276:2006 Foodstuffs - Nucleic acid based methods of analysis for genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions
- l'estrazione degli acidi nucleici (pubblicata nel febbraio 2005)
EN ISO 21571:2005 Foodstuffs - Detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction
- l'analisi qualitativa degli acidi nucleici (pubblicata nel giugno 2005)
EN ISO 21569:2005 Foodstuffs - Detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods
- l'analisi quantitativa degli acidi nucleici (pubblicata nel novembre 2005)
EN ISO 21570:2005 Foodstuffs - Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products - Quantitative nucleic acid based methods
- il campionamento (che non sarà pubblicato come vera e propria norma ma come "Technical Specification")
prCEN/TS 21568 Foodstuffs - Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products - Sampling.

La Raccomandazione della Commissione Europea n. 787 del 4 ottobre 2004¹⁴ è relativa agli orientamenti tecnici sui metodi di campionamento e di rilevazione degli organismi geneticamente modificati per facilitare le misure di ispezione e le misure di controllo ufficiale. Essa detta precise regole per l'esecuzione del campionamento degli OGM ed indica agli Stati membri di basarsi per le metodiche di analisi sulle norme tecniche sopra citate e sui metodi specifici validati dal CRL.

¹⁴ Raccomandazione della Commissione del 4 ottobre 2004, GUCE L 348 del 24/11/2004, pag. 18

CAPITOLO 3
L'ETICHETTATURA QUALE RISPOSTA ALLA RICHIESTA INFORMATIVA
DEL CONSUMATORE

Floriana Marin

Il presente capitolo si propone di approfondire le implicazioni, da un punto di vista squisitamente sociale, degli orientamenti e delle misure di intervento adottate dalla Comunità Europea in materia di sicurezza alimentare.

L'APPROCCIO PRECAUZIONALE ALLA SICUREZZA ALIMENTARE

Nell'Unione Europea, il Principio di Precauzione costituisce uno dei fondamenti della politica comunitaria in materia ambientale. Il Trattato di Maastricht, all'art. 2, cita testualmente che *“La politica della Comunità in materia ambientale mira a un elevato livello di tutela, tenendo conto della diversità delle situazioni nelle varie regioni della Comunità. Essa è fondata sui principi della precauzione e dell'azione preventiva (...)”*.

Con la Comunicazione COM (2000)/1¹, la Commissione Europea ha espressamente specificato che il ricorso al Principio Precauzionale è motivato dalla presunzione di effetti negativi associati ad un determinato evento o fenomeno, in situazioni in cui la valutazione scientifica non sia in grado di stimare con precisione l'entità di tali rischi. L'art. 7 del Reg. CE 178/2002², esprime formalmente questi orientamenti, indicando che *“Qualora, in circostanze specifiche a seguito di una valutazione delle informazioni disponibili, venga individuata la possibilità di effetti dannosi per la salute ma permanga una situazione d'incertezza sul piano scientifico, possono essere adottate le misure provvisorie di gestione del rischio necessarie per garantire il livello elevato di tutela della salute che la Comunità persegue, in attesa di ulteriori informazioni scientifiche per una valutazione più esauriente del rischio”*.

¹ COM (2001)/1 def del 2 febbraio 2000, bollettino UE 1/2-2000 punto 1.4.60
URL:<<http://europa.eu/bullettin/it/200001/p104060.htm>>

² Regolamento CE 178/2002 del 28 gennaio 2002, GUCE L 31 del 1/2/2002, pag. 9

In conformità a queste premesse, il campo di applicazione del Principio di Precauzione, all'interno dell'UE, rappresenta il criterio di riferimento principe anche per la gestione della sicurezza alimentare e, in questo contesto, per la gestione dello sviluppo e diffusione di OGM sul territorio comunitario.

In virtù del Principio di Precauzione, è sufficiente la percezione di un rischio per la salute o l'ambiente per applicare restrizioni o veti sulla circolazione di prodotti GM all'interno del mercato comunitario. Non stupisce dunque che l'applicazione di tale Principio possa sollevare critiche e determinare anche tensioni con alcuni Paesi esportatori di OGM (Pinstrup-Andersen, 1999; Hathcock, 2000). L'utilizzo di varietà colturali GM, infatti, si è intensificato sempre di più a livello mondiale. Secondo il rapporto *dell'International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications* (ISAAA), nei primi dieci anni di commercializzazione dei prodotti GM (1996-2005), l'area mondiale complessivamente destinata alla loro coltivazione è aumentata di più di cinque volte. Nel 2005, le colture biotech hanno occupato una superficie di circa 90 milioni di ettari, con una crescita di circa 9 milioni rispetto ai dati disponibili per l'anno 2000 (ISAAA, 2005).

A livello globale, come illustrato in Figura 1, il territorio degli Stati Uniti ospita l'area maggiormente coltivata a scopi commerciali. L'esperienza nella coltivazione di piante transgeniche a scopi commerciali è, invece, ancora molto limitata sul territorio dell'Unione Europea. Ad oggi sono la Spagna (dal 1998, in virtù di un codice di condotta non vincolante) e la Romania a detenere il primato come Paesi UE con la maggiore superficie destinata, rispettivamente, a colture di mais e soia GM. Anche in altri Paesi dell'Unione si possono trovare aree di coltivazioni GM, ad esempio in Francia, in Germania, in Portogallo e nella Repubblica Ceca; la loro estensione, tuttavia, è molto esigua.

In forza degli orientamenti di tipo precauzionale accolti all'interno dell'Unione Europea, il rilascio di OGM nell'ambiente e il loro accesso al mercato comunitario sono disciplinati da specifiche procedure autorizzative preliminari che devono garantire la sicurezza per i cittadini e per l'ambiente (European Parliament and Council, 2002; European Commission, 2006).

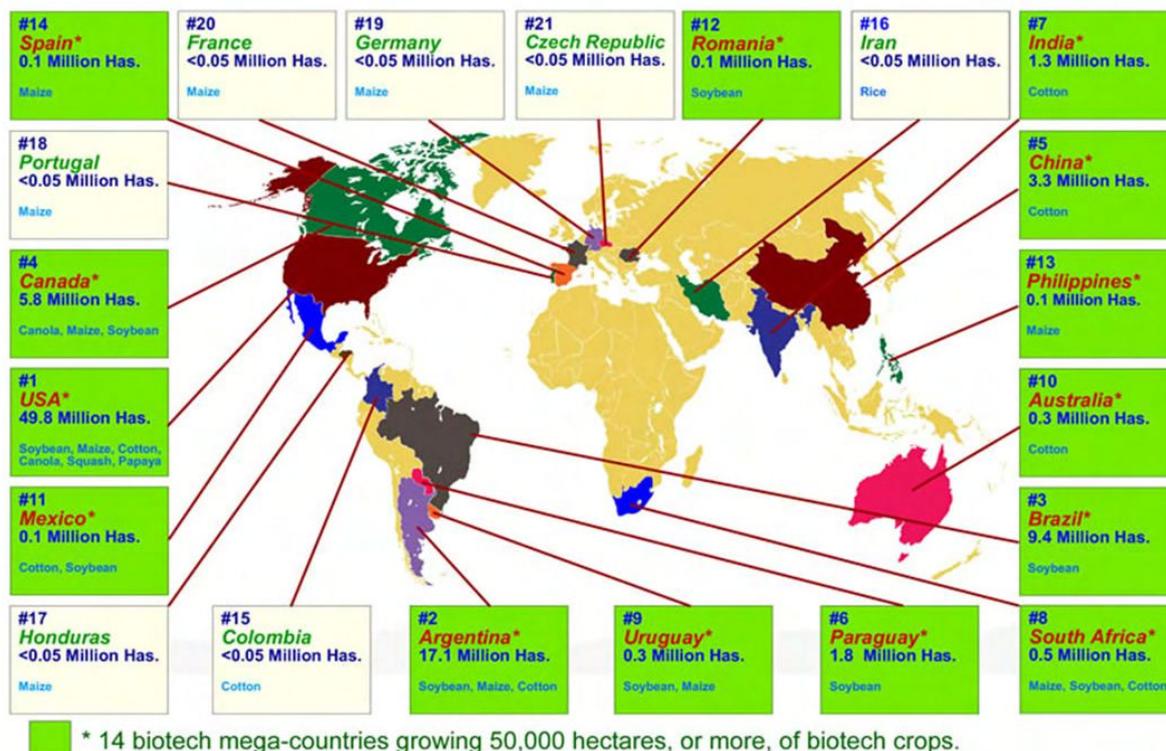


Figura 1 Diffusione mondiale delle colture geneticamente modificate

Fonte: <http://www.isaaa.org>

I Regolamenti 1829/2003³ e 1830/2003⁴ hanno armonizzato il sistema comunitario di etichettatura e tracciabilità attivando una procedura sistematica di sicurezza alimentare finalizzata a fornire ai cittadini-consumatori dell'UE informazioni accurate sulla composizione e sulle caratteristiche dei prodotti per l'alimentazione umana e animale immessi sul mercato.

PERCEZIONE DEL RISCHIO NELL'INNOVAZIONE

Nonostante le complesse procedure di monitoraggio previste ai fini di autorizzare il rilascio di OGM sul territorio europeo, l'atteggiamento dei cittadini-consumatori nei

³ Regolamento CE 1829/2003 del 18 ottobre 2003, GUCE L 268 del 18/10/2003, pag. 1

⁴ Regolamento CE 1830/2003 del 22 settembre 2003, GUCE L 268 del 18/10/2003, pag. 24

confronti delle applicazioni del trasferimento genico si mantiene su una linea di sostanziale diffidenza (Bredahl, 2001).

La percezione sociale del rischio associato al consumo di OGM sembra sproporzionata rispetto ad altri tipi di interventi, azioni o abitudini, come potrebbero essere il tabagismo o una dieta eccessivamente ricca di lipidi, che presentano fattori di rischio scientificamente dimostrati essere più elevati ed immediati (Martinelli, 2004).

Come per altre applicazioni tecnologiche e scientifiche, gli OGM sono oggetto di un dibattito sociale controverso, a volte violento, che disegna uno scontro ideale tra una Società, che cerca di tutelare il proprio diritto all'incolumità dai danni reali o potenziali provocati dall'innovazione, ed una Scienza, che rivendica il diritto alla ricerca (Dulbecco, 2001; Bassoli, 2002).

I risultati di alcuni studi sociali sull'argomento sembrano avvalorare l'ipotesi che tale ostilità non si riversi contro la Scienza in sé, ma piuttosto contro certi suoi aspetti e in generale laddove siano ben visibili dei rischi (per la salute, per l'ambiente, per il mantenimento di certi equilibri), ma non siano altrettanto chiari i benefici (Gaskell *et al.*, 2004). Si aggiunga che la Società, intesa come pluralità di individui differenti, non sempre appare dotata degli strumenti, o di tutti gli strumenti, atti a formulare una scelta consapevole. D'altro canto, le vicende degli ultimi anni hanno dimostrato che comunicare i risultati ed i progressi della scienza al pubblico non si risolve – almeno non in linea generale – con tentativi generalizzati di “educazione” dall'alto (modelli *top-down*), promozione e divulgazione di massa (Bucchi, 2004).

Esiste, oggi, un ampio dibattito sul tema del rischio, a causa del duplice significato rivestito dal termine. In senso strettamente tecnico il concetto di “rischio” si riferisce al valore atteso delle perdite e dei danni dovuti al verificarsi di un particolare fenomeno di data intensità (in inglese, *hazard*). Tali effetti sono stati analizzati attraverso un processo sistematico di misurazione e previsione del danno (stima), che presenta elevati livelli di tecnicità e accuratezza (Sandman, 1999).

L'entità e la magnitudo delle conseguenze di una determinata azione o scelta sono oggetto anche di un altro sistema di valutazione, parallelamente attivato. Lo stesso fenomeno che la Scienza tratta da un punto di vista strettamente tecnico, al momento di raffrontarsi con la Società diventa oggetto di un processo di pesatura in cui la

componente etica e sociale, il contesto di riferimento e la cultura dominante incidono sulla percezione complessiva delle dimensioni del “rischio” (qualificato dal termine inglese *outrage*) (Sandman, 1999). Questo tipo di valutazione non utilizza dati, statistiche, elaborazioni, ma si basa soprattutto su attitudini, sensazioni, esperienze vissute, credenze e opinioni (Martinelli, 2004).

I processi di valutazione del rischio tecnico e non-tecnico possono seguire binari differenti e questo spiegherebbe perché in alcuni casi, nonostante la valutazione scientifica non abbia evidenziato la possibilità di danni di portata rilevante, la reazione di rigetto del pubblico si manifesti con sorprendente impeto e violenza (Martinelli, 2004; Marin & Martinelli, 2005).

APPROCCIO DI TIPO “PARTECIPATO” ALL’INNOVAZIONE

Nell’ottica di un avanzamento e di una crescita tecnologica condivisa si pone con forza la necessità di considerare pienamente i rischi e i potenziali dell’agire umano e le modalità più efficienti per il governo di tale sviluppo, con la consapevolezza che il tentativo avverrà in un contesto caratterizzato da complessità. Ugualmente, dovrebbe essere meglio compreso che l’introduzione nella quotidianità di talune innovazioni, quali le applicazioni delle tecniche di DNA ricombinante, presuppone la necessità di confrontarsi anche con le dinamiche e le implicazioni del cambiamento sociale da esse generato.

In questa fase, la partecipazione attiva alle decisioni scientifiche ed al trasferimento tecnologico gioca un ruolo di preminenza per lo sviluppo e il consolidamento dell’innovazione all’interno della Società che la accoglie (Greco, 2005).

Tale consapevolezza, peraltro, costituisce già la base di quelle procedure di “democrazia deliberativa” così ampiamente usate nei Paesi del Nord Europa per legittimare scelte istituzionali in presenza di interessi molteplici (Habermas, 1989; Fishkin, 2000; Pettit, 2001).

All’interno dell’Unione Europea, un approccio simile si è consolidato nel riconoscimento delle procedure di *Scelta Informata* (Spoel, 2004), formalizzato dal

sistema di etichettatura, per consentire una partecipazione civica più attiva e consapevole ai processi decisionali.

La necessità che i cittadini-consumatori siano pienamente informati in merito alle possibili implicazioni (positive o negative) di una determinata questione, ribadita dall'art. 8 del Reg. 178/2002/EU² per gli aspetti relativi alle politiche di sicurezza alimentare, risponde con coerenza all'art. 153 del Trattato di Maastricht sul diritto dei consumatori all'informazione.

In accordo a tale principio, le normative comunitarie sulla sicurezza alimentare (nel caso di OGM armonizzate nei Regolamenti CE 1829/2003³ e 1830/2003⁴) formalizzano l'uso dell'etichetta quale strumento cardine per la scelta alimentare.

ETICHETTATURA E SCELTA

Se dal punto di vista istituzionale l'etichettatura può essere vista come strumento principe per garantire elevati livelli di sicurezza alimentare, è interessante verificare se essa, di fatto, risponda concretamente alle esigenze di trasparenza, informazione, consapevolezza dei cittadini-consumatori.

Molti sondaggi e studi socio-economici sono stati condotti proprio per comprendere come il cittadino europeo giudica l'etichetta e se essa può costituire un efficace ausilio nell'esercizio di scelte ragionate e consapevoli.

L'Università di Ghotenburg (Carlsson *et al.*, 2004) ha esaminato quali possibili reazioni avrebbero suscitato nei cittadini svedesi ipotetiche politiche di etichettatura obbligatoria per i prodotti alimentari GM o di bando totale dei mangimi GM dalla produzione agro-alimentare.

Ai cittadini-consumatori intervistati durante lo studio è stato preliminarmente specificato che tali misure sarebbero state finalizzate alla tutela della sicurezza alimentare, ma che il loro sostenimento avrebbe determinato un aumento nel prezzo di vendita negli alimenti interessati.

Il valore assegnato dai cittadini all'utilità delle nuove politiche di sicurezza alimentare si poteva estrapolare valutando le diverse disponibilità a sostenere il correlato aumento dei prezzi negli alimenti.

Le persone coinvolte nell'indagine hanno espressamente manifestato una forte volontà ad accettare aumenti di prezzo, anche consistenti, perché le proprie scelte di consumo potessero essere supportate da uno strumento di informazione concreto quale l'etichetta. Un comportamento analogo è stato rilevato con riferimento all'ipotesi di un bando totale all'uso di mangimi GM.

Usando la stessa metodologia dei colleghi svedesi, anche i ricercatori dell'Università di Manchester (Rigby *et al.*, 2004) hanno quantificato l'importanza di un efficiente sistema di etichettatura sugli OGM in termini di disponibilità a pagare un sovrapprezzo sugli alimenti. Il risultato dello studio è molto simile a quello ottenuto in Svezia. È interessante specificare, inoltre, che per gli intervistati del Regno Unito l'applicazione efficace dell'etichettatura, fornendo un valido strumento di scelta e selezione al cittadino-consumatore, non precluderebbe la presenza di prodotti GM sul mercato.

Di conseguenza, se i cittadini britannici potessero contare su uno strumento informativo affidabile, la vicinanza di alimenti GM e non-GM negli scaffali dei supermercati apparirebbe socialmente tollerabile.

Nell'ambito del Progetto *OSSERVA3*, il fenomeno della percezione del rischio connesso agli OGM da parte di cittadini e *stakeholders* è stato analizzato da un punto di vista qualitativo con l'organizzazione di alcuni *focus groups* ed incontri pubblici sul territorio trentino (Martinelli *et al.*, 2005). L'esperienza maturata in questo studio ha ulteriormente rafforzato la convinzione che la scelta istituzionale europea di etichettare gli alimenti può rispondere efficacemente alla richiesta di diritto di scelta individuale del consumatore. Sia gli operatori della filiera agro-alimentare, sia i cittadini in veste di consumatori reclamano, infatti, un'informazione corretta e completa sul prodotto, tale da consentire una scelta ponderata e consapevole.

I risultati di questo studio mettono in luce, però, anche una diffusa incertezza da parte dei cittadini-consumatori sulla propria effettiva capacità di esercitare il diritto di scelta suffragato dal sistema di etichettatura. I cittadini, infatti, non si sentono solamente consumatori, ma soggetti che propongono interrogativi articolati e profondi di fronte all'innovazione.

Non si tratta solo di acquistare un prodotto piuttosto di un altro; nell'esercizio di una scelta, come anticipato, entrano in gioco ideali, valori etici, processi interiori di giudizio che non possono essere ignorati, allorché si decida di gestire l'innovazione in maniera condivisa.

Per questo motivo, nel caso del trasferimento genico (ma anche di altre nuove tecnologie ad elevato impatto emotivo) risulta giustificato intraprendere un percorso decisionale "sostenibile", che, opportunamente gestito, punti a garantire capillarmente un'informazione trasparente ed il coinvolgimento attivo di tutti gli attori in gioco.

L'etichetta può dunque essere uno strumento in questa direzione. Essa, tuttavia, può acquisire un significato ancora maggiore se inserita in un più generale piano di gestione e comunicazione del rischio attenta alle istanze tecniche, ma soprattutto non-tecniche formulate dalla Società. Un dibattito aperto e condiviso, infatti, può ragionevolmente essere visto come un punto fermo di ogni esercizio di governo di innovazioni dalla portata rilevante, quali possono essere le applicazioni delle biotecnologie.

CAPITOLO 4

CAMPIONAMENTO

Chiara Nobili, Lorenza Dalla Costa

La potenziale presenza di organismi geneticamente modificati (OGM) negli alimenti, nei mangimi e in tutte le matrici di utilizzo nella catena agroalimentare, rappresenta un tema di estremo impatto per la rispondenza a standard di qualità prefissati dagli enti preposti ai controlli e alla certificazione, interessando contemporaneamente aspetti di tipo sanitario, ambientale, etico, socio-economico e politico. Oggi, il mercato richiede di garantire che il prodotto destinato al consumo non provenga da materie prime geneticamente modificate. Questo implica, di conseguenza, la definizione di metodologie specifiche che soddisfino soprattutto criteri di praticabilità e di attendibilità, nell'accertamento diagnostico della presenza degli OGM nelle matrici considerate.

Per quanto riguarda il campionamento, le procedure utilizzate per l'analisi delle micotossine rappresentano le basi su cui si fondano gli schemi per il campionamento di OGM. La direttiva 98/53¹ riguardante il campionamento e l'analisi di alcuni contaminanti negli alimenti è stata la prima linea guida di campionamento per gli OGM ed è oggi ancora utilizzata.

La determinazione del contenuto di OGM in materiale non processato è soggetta ad errore durante le varie fasi della "catena diagnostica" (campionamento, sottocampionamento e analisi): qui, la rappresentatività del campionamento sta alla base di tutta l'analisi. Per questo è indispensabile effettuare il prelievo in modo accurato, cercando di campionare diversi punti del prodotto (Miraglia *et al.*, 1998; Kay & Paoletti, 2002; Miraglia *et al.*, 2004).

Spesso, in un campione, il materiale OGM non ha una distribuzione omogenea, per cui la variabilità associata alla fase di campionamento rappresenta il maggior contributo alla variabilità totale. Minore è la presenza di materiale GM nel campione, maggiore sarà l'effetto delle differenti strategie utilizzate per il campionamento.

¹ Direttiva 98/53/CE del 16 luglio 1998, GUCE L 201 del 17/7/1998, pag. 93

In generale gli errori accettati durante un campionamento sono direttamente associati sia al rischio per il consumatore, definito come accettazione di lotti composti da materiale contenente OGM al di sopra dei limiti di tolleranza, sia al rischio per il produttore, definito come la possibilità di rifiutare un lotto contenente materiale a percentuale OGM maggiore del limite previsto per legge. Maggiore è l'entità del rischio, minore sarà l'errore tollerato sulla procedura di campionamento utilizzata.

Una priorità assoluta è anche la necessità di rispettare i requisiti legislativi e garantire la qualità dei lotti presenti sul mercato.

Le modalità di campionamento da applicare ai prelievi per il controllo degli OGM nei prodotti agricoli sfusi e negli alimenti e mangimi preconfezionati sono state recentemente definite con la Raccomandazione della Commissione Europea del 4 ottobre 2004, relativa agli orientamenti tecnici sui metodi di campionamento e di rilevazione degli organismi geneticamente modificati e dei materiali ottenuti da organismi geneticamente modificati come tali o contenuti in prodotti (Reg. CE n.1830/2003)². I campi di applicazione disciplinati dalla Raccomandazione sono i seguenti:

- campionamento di prodotti agricoli sfusi;
si raccomanda che il campionamento di prodotti sfusi (granelle, semi oleosi) avvenga secondo i principi generali e metodi di campionamento descritti nelle norme ISO 6644 e 13690. Il campionamento di materiali di dimensioni maggiori rispetto alle granelle dovrebbe essere effettuato secondo la norma ISO 2859;
- campionamento di lotti di alimenti e mangimi preconfezionati;
il campionamento degli alimenti e dei mangimi preconfezionati dovrebbe essere svolto secondo le procedure descritte nella norma ISO 2859.

In generale, le strategie di campionamento devono tenere conto di molti parametri quali *in primis*, la natura dell'analita e la sua distribuzione. Nella definizione di un piano di campionamento per grandi volumi di campione i parametri principali da tenere in considerazione sono la grandezza e l'uniformità del lotto, il rischio accettato (tolleranza) e il metodo di analisi adottato, mentre i parametri da stabilire sono la

² Raccomandazione 2004/787/CE, GUCE L 348 del 24/11/2004, pag. 18

grandezza del prelievo, la frequenza e la preparazione del campione prima dell'analisi (Kay & Paoletti, 2002). Infine, sono da considerare alcuni aspetti pratici come i costi e la capacità nel campionare.

Quest'ultimo aspetto può essere infatti associato ad alcune difficoltà attribuibili alla merce o alla situazione, quali, ad esempio, il campionamento di materiale in movimento durante il caricamento o lo scaricamento che appare più complesso rispetto al campionamento di un volume immobile.

La tabella 3 riporta alcuni modelli di campionamento che differiscono tra loro in molti aspetti interessanti. La maggior parte dei modelli di campionamento non sono specifici per gli OGM, tuttavia sono stati sviluppati metodi specifici per semi e granaglie GM a cura del CEN e di USDA/GIPSA. Brera e collaboratori dell'Istituto Superiore di Sanità (personal communication) hanno definito un piano di campionamento basato sullo sviluppo di un modello in scala studiato in laboratorio e trasferito su volumi reali. Questo consente di ridurre la varianza totale associata alla determinazione di OGM in un lotto, dal campionamento all'analisi. Kay & Paoletti (2002) hanno pubblicato una visione d'insieme sulle strategie di campionamento per il controllo di grandi stive contenenti granaglie, ingredienti primari e specifici ingredienti processati derivanti da materiale GM. I differenti piani di campionamento sono paragonati tra loro rispetto alla sezione del lotto, alla velocità di campionamento, agli incrementi e alla preparazione del campione di laboratorio.

Ai fini di definire protocolli di campionamento sempre più efficaci, riveste un ruolo di particolare importanza lo studio condotto nell'ambito del progetto KeLDA (Kernel Lot Distribution Assessment) ideato e coordinato, nel 2003, dall'unità Biotechnology and GMOs della Commissione Europea in collaborazione con ENGL (European Network of GMO Laboratories), finalizzato alla valutazione della distribuzione di materiale GM in lotti di granelle importati nell'Unione Europea.

Il progetto ha molteplici obiettivi tra cui valutare quali siano realmente i livelli di concentrazione ed eterogeneità degli OGM in lotti di granelle, permettere di completare lo sviluppo di un nuovo modello statistico per la definizione di protocolli di campionamento di semi e granelle (con un *software* ideato *ad hoc*), arrivare alla formulazione di protocolli di campionamento alternativi a quelli attualmente in uso e

specifici per la problematica OGM, permettere un confronto diretto dell'efficienza di diverse tecniche di analisi molecolari nei saggi di rintracciabilità degli OGM.

Il progetto si articola in più fasi, con il coinvolgimento di dieci laboratori di otto diversi Paesi Membri e Candidati, i risultati ottenuti con il progetto KeLDA costituiranno il supporto scientifico per la definizione e armonizzazione delle procedure di controllo degli OGM in ambito europeo.

In conclusione, quindi, nella scelta di una procedura di campionamento il livello di incertezza è un fattore decisivo. Quindi l'utilizzo di una procedura di campionamento affidabile e la definizione dell'errore associato alla metodologia di campionamento sono fattori cruciali per le parti coinvolte nella catena del controllo, dal produttore al consumatore, è comunque da ricordare che una valutazione quantitativa dell'errore associato ad uno specifico piano di campionamento per OGM non è ancora stata sviluppata.

Possiamo infine commentare che è buona regola, di prassi, verificare sempre la fattibilità delle procedure di campionamento teorico da un punto di vista pragmatico.

Fonte	Dimensione derrata	Tolleranza	Dimensione campione	Campione di laboratorio	Incremento	Dimensione incremento
ISTA (1)	varie a seconda della specie: da 10.000 kg a 40.000 kg (max)	5%	1 kg	1 kg (circa 3.000 semi)	da 300 kg a 700 kg	non indicata
USDA/GIPSA (2)	fino a 10.000 bushel (circa 245.000 kg) o 10.000 sacchi se il lotto non è sfuso	5%	come "campione di laboratorio"	circa 2,5 kg, ma non meno di 2 kg	3 tazze o 1 prelievo per 500 bushel (circa 12.000 kg)	1,25 kg
USDA/GIPSA, StarLink™ (3)	segue le linee guida di USDA/GIPSA	non indicata	almeno tre volte il campione di laboratorio	2400 semi	non indicata	da 0,2 kg a 0,5 kg, ma in pratica fino a 5 kg
ISO 13690 (4)	fino a 500.000 kg	non indicata	non indicata	> 1 kg (per semi)	da 15 kg a 33 kg (per un volume immobile < 50.000 kg) quanti possibili per materiale in movimento	non indicata
ISO 542 (5)	fino a 500.000 kg	non indicata	100 kg	da 2,5 kg a 5 kg	da 15 kg a 33 kg per volumi sciolti (fino a 500.000 kg)	0,3 kg
EU Dir. 98/53 (6)	senza limiti se non è separabile, se no fino a 500.000 kg	20%	30 kg (se la dimensione del lotto è 50.000 kg) 10 kg (se la dimensione del lotto è < 50.000 kg)	10 kg	fino a 100 kg	0,5 kg, ma in pratica fino a 5 kg
CEN (7)	fino a 500.000 kg	non indicata	20 volte il campione di laboratorio	100.000 semi	da 15 kg a 33 kg (per un volume immobile < 50.000 kg) quanti possibili per materiale in movimento	non indicata
FAO/WHO (8)	non specificato	non indicata	varie proposte	non indicata	non indicata	non indicata

Tabella 3 Piani di campionamento per lotti di semenze

(1): ISTA, 2003; (2): USDA/GIPSA, 2000; (3): USDA/GIPSA, StarLink™, 2001; (4): ISO, 1999; (5): ISO, 1990; (6): European Commission, 1998; (7): CEN, 2001; (8): FAO/WHO, 2002.

CAPITOLO 5

ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL DNA

Chiara Nobili, Lorenza Dalla Costa

L'estrazione e la purificazione degli acidi nucleici sono le prime fasi analitiche in molti studi di biologia molecolare. Il DNA estratto deve essere rappresentativo del campione in esame. L'obiettivo primario dei metodi di estrazione è quello di ottenere DNA con il più basso livello di degradazione possibile, di tale purezza da poter essere impiegato efficacemente nelle successive analisi quali-quantitative, fondamentalmente basate sulla *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Eventuali contaminanti residui, infatti, potrebbero inibire l'efficienza dell'analisi di PCR.

L'efficienza del metodo di estrazione dipende dalle caratteristiche del campione (sementi, matrice alimentare o mangime). Ad esempio, estrarre DNA dal cioccolato, da olio, da farina di mais o da un mangime a composizione complessa è molto diverso. Più semplice (in termini di varietà di ingredienti) e meno processato sarà il campione, migliore sarà il DNA estratto in termini di qualità e resa.

Sono qui di seguito riportati alcuni tra i metodi più usati per l'estrazione e purificazione del DNA descritti in letteratura che sono applicati all'analisi per la rintracciabilità OGM.

Ricordiamo, inoltre, che sono disponibili in commercio vari kit per l'estrazione di DNA corredati di reagenti già pronti, per le cui descrizioni inviamo ai cataloghi delle ditte specializzate.

Metodo alcalino (Klinsky *et al.*, 1993; Zimmermann *et al.*, 1998)

Omogeneizzare fino a 350 mg di campione e aggiungere 250 μ l di NaOH 0,25 M. Incubare in acqua bollente per 30 s e neutralizzare la soluzione con 250 μ l di HCl 0,25 mM e una soluzione neutralizzante (0,25% Nonidet P-40, 500 mM TRIS-HCl a pH8). Bollire 2 min. Centrifugare il campione per 5 min a 14.000 rpm e filtrare il surnatante usando un filtro da 0,2 μ m. Conservare il campione a -18 °C.

Metodo ROSE (Steiner *et al.*, 1995; Zimmermann *et al.*, 1998)

Omogeneizzare fino a 350 mg di campione e aggiungere 800 µl di buffer "ROSE" (1% SDS, 1% polivinilpolipirrolidone, 10 mM TRIS-HCl a pH8, 312,5 mM EDTA a pH8). Agitare con vortex per 20 sec e incubare a 90 °C per 20 min in un agitatore. Mettere il campione in ghiaccio per 5 min, agitare con vortex e centrifugare per 2 min a 14.000 rpm. Trasferire il supernatante in una eppendorf da 1,5 ml. Conservare il campione a -18 °C.

Metodo Chelex 100 (Walsh *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.* 1998)

Omogeneizzare fino a 350 mg di campione e aggiungere 860 µl di buffer TNECH 1X (10mM TRIS-HCl a pH 8, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% SDS, 5% Chelex 100, 40µl proteinasi K (20 mg/ml) e 100 µl di guanidinaidrocloreuro 5 M. Agitare con vortex e incubare a 55 °C per 3 ore in un agitatore e poi incubare in acqua bollente per 8 minuti. Agitare con vortexare e centrifugare per 3 min a 15.000 rpm. Trasferire il supernatante in una eppendorf da 1,5 ml. Conservare il campione a -18 °C.

Metodo silica-based (Hoss & Paabo, 1993; Huang *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2000)

Raccogliere circa 100 mg di foglia fresca e metterla in una eppendorf. Con l'aiuto di azoto liquido tritare il tessuto fino a ridurlo in polvere. Aggiungere 200 µl di HB buffer (2% CTAB, 100 mM TRIS-HCl a pH8, 1,4 M NaCl e 50 mM EDTA) e 0,2% mercaptoetanololo. Aggiungere 500 µl di buffer HB, agitare ed incubare a 65 °C per 20 min, agitando di tanto in tanto. Aggiungere 700 µl di buffer EB (cloroformio: alcol isoamilico (24:1) seflaglas BP, 4 M guanidina tiocianato e TE a pH 8,5) e agitare capovolgendo per 1 min. Centrifugare a 10.000 rpm per 5 min. Trasferire il supernatante in una eppendorf nuova. Aggiungere 1 volume di GuSCN (4 M guanidina tiocianato) e portare a pH 6,5 con HCl. Aggiungere 15 µl di silice in sospensione e incubare a temperatura ambiente per 5 min agitando di tanto in tanto. Centrifugare a 8.000 rpm per 30 sec ed eliminare il surnatante. Risospendere con 500 µl di etanolo al 70% e centri-fugare a 8.000 rpm per 30 sec e scartare il surnatante. Ripetere lo step. Far seccare il pellet a temperatura ambiente per 15 min. Aggiungere 100 µl di TE ed incubare a 60 °C per 10 min. Dopo la centrifuga a 12.000 rpm per 30 sec, trasferire la soluzione contenente il DNA in una nuova eppendorf.

Metodo Wizard (Gachet *et al.*, 1998; Studer *et al.*, 1998; Lipp *et al.*, 1998; Zimmermann *et al.*, 1998)

Omogeneizzare fino a 350 mg di campione e aggiungere 860 µl di buffer TNE 1X (10 mM TRIS-HCl a pH8, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% SDS), 40 µl proteinasi K 20 mg/ml e 100 µl di 5 M guanidina idrocloruro. Incubare il campione per 3 ore a 55 °C in un agitatore. Centrifugare per 10 min a 4 °C e 14.000 rpm. Aggiungere a 500 µl di supernatante 1 ml di resina Wizard. Agitare invertendo. Applicare il vuoto alla mimicolonna e lavare la resina con 2 ml di isopropanolo al 80%. Centrifugare a 14.000 rpm per 1 min e lasciare evaporare per 10-15 min a temperatura ambiente. Eluire il DNA con 50 µl di TE preriscaldato a 70 °C, centrifugare a 14.000 rpm per 2 min e conservare a -20 °C.

Metodo CTAB (Gachet *et al.*, 1998; Zimmermann *et al.*, 1998; Lipp *et al.*, 1998; Tinker *et al.*, 1993; Zhang & Weiner, 2000)

Omogeneizzare fino a 350 mg di campione e aggiungere 500 µl di buffer CTAB (50 mM CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM TRIS-HCl a pH8, 20 mM EDTA) ed incubare a 65 °C per 30 min. Centrifugare per 10 min a 14.000 rpm. Trasferire il supernatante in un'epENDORF nuova aggiungere 200 µl di cloroformio e centrifugare ancora per 10 min a 14.000 rpm. Trasferire il supernatante in una nuova epENDORF e precipitare con 1 vol di isopropanolo e centrifugare per 10 min a 14.000 rpm. Scartare il surnatante e lavare il pellet con 500 µl di etanolo al 70%. Far seccare il pellet dissolverlo in 100 µl di TE e conservare a -20 °C.

Sottolineiamo alcuni aspetti da confrontare dei differenti metodi di estrazione di DNA presentati sopra:

- la qualità del DNA estratto;
- la resa del DNA estratto;
- i tempi;
- i costi.

Per quanto riguarda la qualità del DNA estratto, i metodi sopra citati possono essere suddivisi in due gruppi. Il primo gruppo, comprendente il metodo CTAB, i metodi che si avvalgono dell'utilizzo di resine e il metodo Wizard, ha dimostrato di poter estrarre DNA di alta qualità. Il secondo gruppo, comprendente i metodi Chelex 100, ROSE e alcalino, sembra fornire DNA di qualità inferiore.

Per quanto riguarda la resa, si è visto che i metodi CTAB, i metodi che si avvalgono dell'utilizzo di resine e il metodo Wizard hanno una percentuale di recupero inferiore al 20%. Una minore resa si attribuisce al metodo CTAB, probabilmente dovuta alla perdita di DNA durante la separazione con cloroformio oppure alla bassa efficienza della precipitazione specifica. Un recupero notevolmente più alto è stato riscontrato nell'utilizzo dei metodi alcalino, ROSE e Chelex 100 per i quali risulta intorno al 70-80%.

Per quanto riguarda i tempi ed i costi, i metodi basati sull'uso di resine, anche se da un lato dimostrano avere una bassa resa ma una migliore qualità del DNA estratto, dall'altro presentano dei costi relativamente alti e tempi lunghi di processamento dovuti a lunghe incubazioni. Infine, i metodi più veloci, semplici ed economici sono quelli basati sulla semplice lisi cellulare.

È comunque stato provato che solventi utilizzati in alcuni dei metodi citati interferiscono e/o inibiscono eventuali processi successivi, come le analisi di PCR. Quindi, sarebbe opportuno verificare la compatibilità del metodo di estrazione rispetto al trattamento cui verrà sottoposto il campione da analizzare.

Va ricordato, infine, che tutti i metodi di estrazione menzionati hanno un limite di saturazione, indipendentemente dalla quantità iniziale di DNA utilizzato. Quando si devono estrarre grandi quantità di DNA, pertanto, è consigliabile frazionare il campione in sottounità ed ognuna di queste dovrà essere trattata indipendentemente.

In sintesi, tra i metodi proposti, il metodo Wizard è quello utilizzato ufficialmente nello "*Swiss food manual*" (1998), il metodo CTAB è quello più economico, il metodo Chelex 100 è quello utilizzato nelle analisi forensi, i metodi ROSE e alcalino sono molto veloci e semplici nell'esecuzione.

Inoltre, assumendo che non ci siano inibitori nella matrice alimentare analizzata, potrebbe essere preferibile utilizzare in un primo screening di estrazione, protocolli veloci ed economici avvalendosi di kit commerciali. Questi posseggono il vantaggio di ridurre drasticamente i tempi sperimentali necessari a svolgere la procedura analitica e a ridurre o ad abolire del tutto l'uso di solventi organici.

Nell'ambito del progetto *OSSERVA3*, l'estrazione del DNA è stata curata con molta attenzione, essendo questo uno dei punti cruciali di tutta l'analisi. La scelta del metodo di estrazione da adottare nel nostro laboratorio è stata dettata da alcuni criteri quali una buona qualità del DNA estratto e il basso costo, tenendo anche conto che una purificazione ottimale dovrebbe garantire una buona qualità e omogeneità del DNA estratto oltre che l'assenza di RNA, proteine o altri composti inibitori.

Per quanto riguarda il fattore tempo, essendo il nostro un laboratorio di ricerca e pertanto non dovendo analizzare per *routine* quantità notevoli di campioni, non era necessario abbattere drasticamente i tempi di esecuzione. La nostra preferenza è stata attribuita all'economico metodo CTAB, a cui abbiamo apportato alcune modifiche per ottimizzarne la resa di estrazione. Il protocollo è riportato nel secondo paragrafo del capitolo 8.

CAPITOLO 6

TECNICHE ANALITICHE PER LA RINTRACCIABILITÀ DI OGM

Lorenza Dalla Costa, Chiara Nobili

Come già discusso nel capitolo 2, i Regolamenti Europei stabiliscono l'obbligo di etichettatura per tutti i prodotti che contengono OGM, con una soglia di tolleranza fissata allo 0,9% per gli OGM autorizzati e allo 0,5% per gli OGM in via di autorizzazione, già approvati dal comitato scientifico europeo. Pertanto, risulta di cruciale importanza la disponibilità di tecniche che consentano di identificare e quantificare in modo accurato e preciso la presenza di OGM negli alimenti e nei mangimi, al fine di controllare la corretta applicazione della legge.

Le principali tecniche analitiche attualmente in uso per l'analisi OGM sono:

- a) tecniche basate sull'analisi del DNA ricombinante introdotto nell'organismo ospite;
- b) tecniche immunoenzimatiche basate sull'analisi delle proteine espresse dal gene introdotto.

Entrambe le tecniche possiedono vantaggi e svantaggi: i primi (a) sono molto sensibili e consentono di raggiungere la massima specificità, mentre i secondi (b) sono poco specifici e sensibili ma di contro, più economici, semplici e veloci. La scelta di quale tecnica applicare ad un'analisi dipende dalla tipologia del campione: tessuti vegetali, semi, sfarinati o alimenti processati e composti, infatti, sono matrici decisamente differenti non solo in termini di complessità, ma principalmente per quanto riguarda la degradazione degli acidi nucleici e della componente proteica (Van Duijn *et al.*, 2002).

L'analisi del DNA si basa principalmente sulla tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (reazione a catena della polimerasi) che consente l'amplificazione di specifiche sequenze di DNA. Nel caso degli OGM, queste sono le sequenze esogene trasferite alla pianta da cui deriva il campione in esame. L'analisi qualitativa si fonda sulla PCR con rivelazione su gel dell'amplificato, da cui emerge la presenza/assenza di un determinato OGM in un campione.

L'analisi quantitativa impiega la Real-time PCR, o PCR in tempo reale, reazione che consente di risalire alla percentuale di OGM presente in un campione (Anklam *et al.*, 1999; Hubner *et al.*, 2001; Bertheau *et al.*, 2002; Host-Jensen *et al.*, 2003).

L'analisi delle proteine attualmente più utilizzata, si basa su saggi immunologici diretti ad evidenziare le proteine transgeniche codificate dal gene esogeno, mediante una reazione antigene-anticorpo. Le tecniche più usate in questo campo sono l'ELISA e il Western blot. Tali metodologie semi-quantitative, tuttavia, necessitano di disporre di estratti proteici non degradati, requisito non ottenibile per matrici molto processate; inoltre, l'accumulo differenziale della proteina transgenica nei differenti tessuti vegetali potrebbe generare risultati fittizi.

Accanto a queste tecniche per la rintracciabilità degli OGM più largamente utilizzate, sono in corso studi volti alla messa a punto e all'implementazione di nuove applicazioni avanzate quali: elettroforesi 2-D, elettroforesi capillare, separazioni multidimensionali in cromatografia di affinità, *protein chips*, *microarrays* a DNA e PNA, tecniche di spettrometria di massa MALDI-TOF-MS ed *electrospray* (Tonge *et al.*, 2001; Laukens *et al.*, 2004).

Qualunque sia la tecnica utilizzata, per garantire risultati affidabili è necessario ottimizzarne vari aspetti legati alla qualità: procedure, reagenti, strumentazione ed operatori. Risulta pertanto di cruciale importanza la “*validazione*” dei metodi. Questo aspetto, per quanto riguarda la Real-time PCR, sarà oggetto del capitolo 7.

CAPITOLO 7

ANALISI QUANTITATIVA: REAL-TIME PCR

Lorenza Dalla Costa, Chiara Nobili, Lucia Martinelli

CONCETTI DI BASE

La reazione a catena della polimerasi (PCR) quantitativa o Real-time PCR, come anticipato nel Capitolo 6, è attualmente l'analisi di punta per la rilevazione di OGM nelle matrici agroalimentari.

Essa permette di monitorare in tempo reale il segnale di fluorescenza emesso da un colorante fluorescente, proporzionale alla quantità di DNA *target* presente in un campione. Confrontando le curve di fluorescenza di un campione incognito con quelle di un controllo, è possibile risalire alla quantità di DNA bersaglio presente nel campione. A differenza di ciò che avviene in una PCR qualitativa o “*end-point*”, in cui l'amplificato viene apprezzato nella fase finale della reazione (quando l'amplificazione ha raggiunto il *plateau* dovuto all'esaurimento dei nucleotidi e alla diminuita efficienza della Taq polimerasi), nella Real-time PCR la quantificazione avviene durante la fase esponenziale dell'amplificazione, rendendo il risultato della quantificazione più preciso ed affidabile.

I parametri che caratterizzano il grafico delle curve di amplificazione di un'analisi di Real-time PCR (Figura 2) sono:

- linea di base (*baseline*): linea orizzontale che indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di fluorescenza;
- linea di soglia (*threshold line*): linea parallela alla linea di base, che interpola le curve di amplificazione nella fase esponenziale (può essere posizionata automaticamente dal software o autonomamente dall'operatore);
- ciclo di soglia (*Ct*) (*threshold cycle*): ciclo di PCR misurato per ciascun campione, in cui la curva di amplificazione interseca la linea di soglia;
- Delta *Ct* (ΔCt): differenza tra il valore di *Ct* ottenuto con la curva di amplificazione del transgene ed il *Ct* ottenuto con la curva di amplificazione del gene endogeno misurata per ciascun campione.

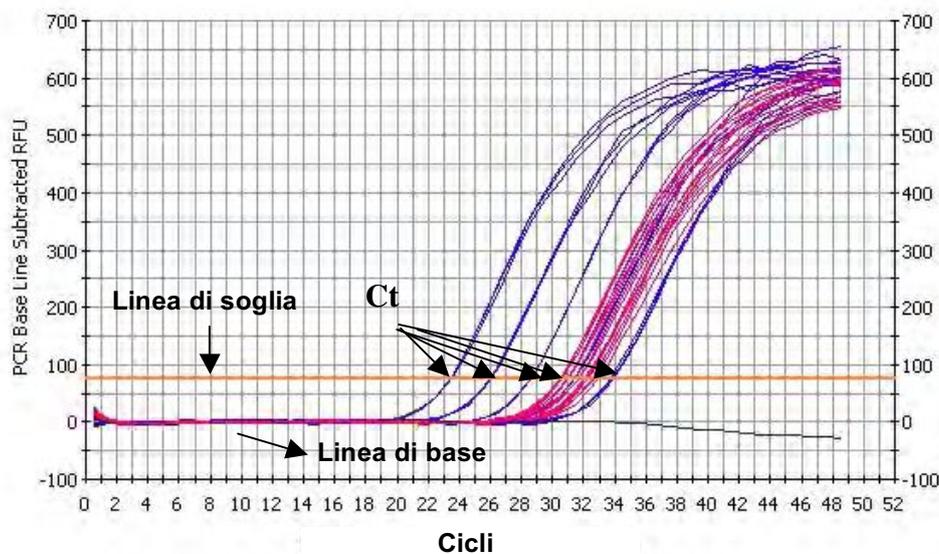


Figura 2 Curve di amplificazione ottenute mediante Real-time PCR

Nell'asse delle ascisse è riportato il numero di cicli di PCR e in quello delle ordinate le "Relative Fluorescence Units" (RFU) rilevate dallo strumento

I parametri che caratterizzano la curva standard o retta di taratura (Figura 3) con la quale possono essere quantificate le percentuali di OGM dei campioni incogniti sono:

- il coefficiente di correlazione (R^2): è una misura descrittiva, indicativa di eventuali errori sistematici e può andare da 0 (nessuna correlazione tra i punti costituenti la retta) a 1 (massima correlazione);
- l'efficienza di amplificazione (E): $= [10^{(-1/slope)}]-1$, risulta inversamente proporzionale alla pendenza della retta di regressione (o *slope*) ed è influenzata dal corretto disegno e dalla buona qualità del sistema di *primer* e sonda, dall'opportuna preparazione dei calibratori per la costruzione della curva standard (DNA puro e corretta diluizione) e dall'utilizzo dei corretti parametri di reazione quali T° di appaiamento e concentrazione di *primer* e sonda.

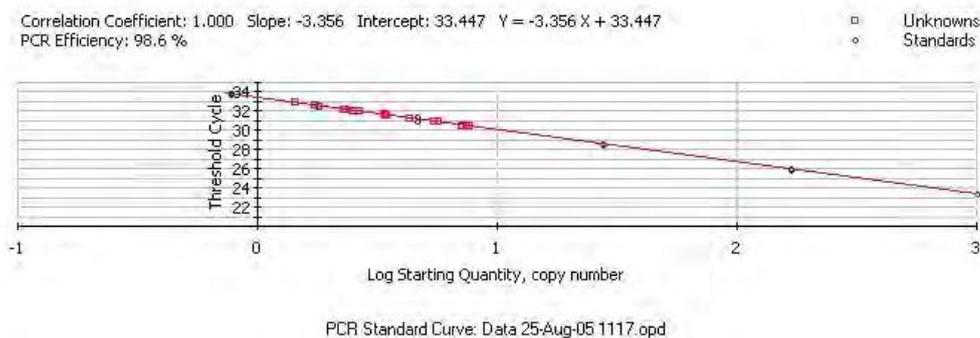


Figura 3 Curva standard o retta di taratura in una reazione di Real-time PCR, ottenuta con il metodo dello “*standard curve*”

Nell’asse delle ascisse è riportato il numero di copie e in quello delle ordinate il numero di cicli

La Real-time PCR e tutti i metodi analitici utilizzati per l’analisi di alimenti per la nutrizione umana ed animale, in accordo al Regolamento 882/2004/CE, per essere accettati dall’Autorità Comunitaria competente, devono essere validati dal *Community Reference Laboratory* (CRL) e dall’*European Network of GMO Laboratories* (ENGL). Affinché un metodo possa essere ammesso al processo di validazione deve avere determinate caratteristiche, in accordo al documento stilato dall’ENGL (Paoletti & Mazzara, 2005). Qui sono definiti i requisiti minimi “*Minimum Performance Requirements*” che un buon metodo analitico per la rivelazione di OGM basato sulla Real-time PCR deve soddisfare per poter essere validato.

Essi sono:

- Applicabilità

affinché sia rispettato questo criterio, devono essere fornite informazioni sullo scopo del metodo, sulle matrici e gli analiti impiegati e sulle le possibili problematiche che possono sorgere con alcuni tipi di matrici;

- Praticabilità

affinché sia rispettato questo criterio, devono essere fornite informazioni sugli strumenti e sui reagenti richiesti per l’analisi e per la preparazione del campione, sui costi dell’analisi (e.g. euro/campione), i tempi e le eventuali problematiche tecniche;

- Specificità

affinché sia rispettato questo criterio, il metodo deve essere evento specifico e deve essere peculiare per l'OGM per cui è stato sviluppato. Ciò deve essere dimostrato con risultati empirici su altri eventi transgenici e su altre specie non transgeniche correlate;

- Range dinamico

affinché sia rispettato questo criterio, il *range* di concentrazioni che il metodo è in grado di quantificare in maniera lineare con un accettabile livello di precisione e accuratezza dovrebbe avere come estremi una concentrazione minima pari a 1/10 di quella dell'analita ed una concentrazione massima pari a 5 volte quella dell'analita. (es. 0,09% e 4,5% per un analita 0,9%);

- Accuratezza

affinché sia rispettato questo criterio, il risultato dell'analisi deve essere compreso all'interno del ± 25 % del valore di riferimento atteso, sull'intero *range* dinamico;

- Efficienza di amplificazione

affinché sia rispettato questo criterio, il coefficiente angolare (*slope*) della retta di taratura, proporzionale all'efficienza di amplificazione (efficienza= $[10^{(-1/slope)}]-1$), deve essere compreso nel seguente intervallo di valori: $-3,1 > slope > -3,6$; l'efficienza del 100% si ottiene con un valore di *slope* pari a -3,32;

- Coefficiente di correlazione (R^2)

affinché sia rispettato questo criterio, il valore di R^2 dovrebbe essere $> 0,98$;

- Coefficiente di variazione (*Repeatability Standard Deviation, RSDr*)

affinché sia rispettato questo criterio, il valore di RSDr di una serie di misure ottenute in condizioni di ripetibilità strette (stesso metodo, stesso protocollo, stesso laboratorio, stesso operatore, utilizzando lo stesso strumento in brevi intervalli di tempo), dovrebbe essere al di sotto del 25% su tutto il *range* dinamico;

- Limite di quantificazione (*Limit Of Quantification, LOQ*)

affinché sia rispettato questo criterio, il LOQ (il più basso livello di analita quantificabile) dovrebbe essere inferiore ad un decimo dei valori soglia indicati dalla legge (i.e. 0,9% per gli OGM autorizzati e 0,5% per gli OGM non ancora autorizzati

ma già oggetto di un parere scientifico favorevole da parte dell'Autorità) con un $RSDr < 25\%$;

- Limite di rivelazione (*Limit Of Detection, LOD*)

affinché sia rispettato questo criterio, il LOD (il più basso livello di analita rilevabile) dovrebbe essere inferiore ad un ventesimo dei valori soglia indicati dalla legge (i.e. 0,9% per gli OGM autorizzati e 0,5% per gli OGM non ancora autorizzati ma già oggetto di un parere scientifico favorevole da parte dell'Autorità) ed essere rilevato almeno 95 volte su 100 prove;

- Robustezza

affinché sia rispettato questo criterio i risultati di un test non dovrebbero presentare scostamenti maggiori del 30%, anche in presenza di piccole ma deliberate variazioni delle condizioni sperimentali descritte nella procedura.

Accanto a questi parametri, l'analisi Real-time PCR è caratterizzata anche da altri aspetti, trattati successivamente, quali i calibratori, i geni di riferimento, i metodi di quantificazione, il metodo di rivelazione, l'unità di misura e l'analisi statistica di base.

CALIBRATORI

Nell'analisi di Real-time PCR degli OGM può essere definito "calibratore" una qualsiasi matrice da cui si ottiene un DNA a percentuale nota di transgene con cui vengono costruite le curve di taratura.

Quale calibratore viene di norma utilizzato Materiale di Riferimento Certificato (CRM) a percentuale nota di OGM (w/w). Queste sono farine a granulometria finissima e controllata preparate da *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM), Belgio e commercializzate dalla ditta Fluka (Figura 4).



Figura 4 Materiali di riferimento certificati (CRM) di mais e soia

La preparazione di questi standard commerciali richiede una procedura complessa, laboriosa e costosa che prevede l'impiego di grandi quantitativi di materie prime non GM (0 %) e totalmente GM (100 %), per la maggior parte semi, che vengono mescolate, omogeneizzate e macinate secondo norme certificate per ottenere miscele rispondenti ai più stretti standard internazionali. Il materiale ottenuto viene poi certificato, suddiviso in aliquote e conservato in condizioni controllate e periodicamente monitorato per verificarne la stabilità. Sono disponibili in commercio per l'analisi quantitativa farine standard a contenuto di OGM pari a 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5% per i principali eventi transgenici, quali Soia RR, Mais Bt-176, Mais Mon-810, Mais Bt-11. Inoltre, recentemente, la ditta Fluka offre nuovi standard per ulteriori eventi, quali mais NK603, GA21 e CBH-3511, colza RT73, OXY235 e MS8xRf3, destinati all'analisi qualitativa.

Questi materiali di riferimento presentano tuttavia alcuni punti deboli: innanzitutto la limitazione del *range* di percentuali (0,1-5%) e degli eventi GM disponibili. La limitazione del *range* di disponibilità è legata ai limiti di legge: essendo questi compresi tra lo 0,5% e lo 0,9%, non sarebbe di fondamentale importanza analizzare campioni che si discostino notevolmente da tali limiti. Una limitazione importante, invece, riguarda il fatto che gli standard Fluka non sono disponibili per tutti gli eventi GM oggi presenti sul mercato europeo e per quelli che verranno presto autorizzati con la nuova normativa (Regolamento EC 1829/2003). Ciò riduce il campo di analisi e di controllo.

Altri limiti degli standard Fluka riguardano la variabilità della percentuale di GMO di riferimento, per cui tra lotti diversi ci possono essere differenze.

Va anche sottolineato, inoltre, che per quanto riguarda lo standard Fluka 0% la ditta stessa, nelle specifiche, non esclude possibili contaminazioni, anche se esigue (< 0,03%). Inoltre, ad ogni standard è associata una misura di incertezza “*expanded uncertainty*” che stima i possibili errori sistematici e altri fattori di variabilità influenti sul processo preparativo, quali l’errore di misurazione della misura di peso, il grado di umidità, la non omogeneità e la non purezza delle matrici.

Infine, la deperibilità del materiale è un ulteriore fattore negativo di questi preparati.

A causa di questi svantaggi tecnici, sta sempre più emergendo la necessità di sviluppare calibratori alternativi agli standard Fluka.

La letteratura riporta varie strategie. Pardigol *et al.* (2003) hanno pubblicato un metodo basato sull’impiego di “*ampliconi ibridi*”, sequenze lineari contenenti il gene endogeno e il transgene in *tandem*, ottenute mediante PCR.

Recentemente, l’impiego di molecole di DNA circolari sembra essere una strategia molto promettente. In accordo, Kuribara *et al.* (2002) hanno proposto un metodo basato su calibratori plasmidici contenenti differenti sequenze *target*, quali la sequenza del gene endogeno di riferimento e le sequenze esogene. Block e Schwarz (2003) hanno messo a punto un’analisi basata su un calibratore “misto” in cui è presente sia DNA plasmidico contenente la sequenza esogena *target* sia DNA genomico. Taverniers *et al.* (2004) hanno confrontato 3 sistemi di calibrazione, quali (i) i CRM Fluka, (ii) una miscela di DNA genomico con un plasmide contenente il gene endogeno e con un altro plasmide recante il transgene e (iii) un plasmide contenente sia il gene endogeno sia il transgene. Gli Autori hanno provato che il terzo metodo risulta essere l’ottimale. Recentemente, Mattarucchi *et al.* (2005), del Joint Research Center (JRC) di Ispra (Varese) hanno discusso in dettaglio i punti di forza e i punti deboli dell’utilizzo di “*tandem-marker plasmid*”, plasmidi contenenti le sequenze rispettivamente di un gene endogeno e di un transgene entrambi in singola copia.

Dai dati emersi nelle pubblicazioni sopra citate, l'innovativo utilizzo di plasmidi per la quantificazione di OGM sembra essere una valida alternativa ai convenzionali CRM, costituendo una strategia meno costosa e più flessibile. È infatti possibile clonare nel plasmide qualunque frammento di DNA e produrre plasmidi evento-specifico in poco tempo e in grandi quantitativi. Inoltre, il DNA plasmidico assicura una più efficiente estrazione ed una maggior purezza rispetto al DNA genomico, e consente una quantificazione del numero di copie molto più accurata.

Anche nel laboratorio IASMA sono stati preparati plasmidi contenenti gene endogeno e transgene in tandem “*tandem marker plasmid*” sia per la soia sia per il mais che sono stati utilizzati con successo per analizzare matrici di diversa natura, tra cui mangimi.

GENI DI RIFERIMENTO

Un affidabile metodo di Real-time PCR dipende dall'utilizzo di geni endogeni di riferimento appropriati. Un gene di riferimento ottimale dovrebbe possedere alcune caratteristiche fondamentali, quali: specie-specificità, presenza in numero di copie per genoma aploide basso, meglio se pari a 1, elevata stabilità genica e bassa eterogeneità tra *cultivar*.

Nelle analisi di matrici a base di soia il gene endogeno più utilizzato è quello per la lectina (*lectin 1*, acc. Number = K00821). Nelle analisi di matrici a base di mais invece, sono vari i geni endogeni candidati. I più utilizzati sono quelli per la zeina (*zein*, acc. number = M23537), l'alcool deidrogenasi (*adh 1*, acc.number = X04050), l'invertasi (*inr*, acc. number = U16123), la *high mobility group protein* (*hmg*, acc. number = AJ131373). Questi geni sono stati vagliati nell'ambito del programma di ricerca QPCRGMFOOD (Hernandez *et al.* 2004) e validati dal *Community Reference Laboratory* (CRL). Inoltre questi geni sono stati di recente valutati in uno studio sulle contaminazioni di soia GM nella farina di mais (Dalla Costa e Martinelli, 2007).

Il gene indicato dal JRC come miglior candidato per essere utilizzato quale gene endogeno di mais è l'*alcohol dehydrogenase*. Esso è stato testato su circa 40 linee di mais dell'Istituto Sperimentale per la cerealicoltura di Bergamo ed in ciascuna è stata rilevata una sola copia. Questo gene viene utilizzato di *routine* nei laboratori del CRL.

Per quanto riguarda la *zeina*, le prove di Real-time PCR da noi effettuate hanno rilevato una significativa variabilità di amplificazione tra matrici di mais differenti. Questa nostra osservazione è emersa anche in esperienze di altri Colleghi e sembra essere attribuibile ad un numero di copie variabile per il gene *zein* tra le varie *cultivar*; accanto, è stata evidenziata una maggior stabilità del gene *invertase*, che tuttavia, in alcune varietà di mais è risultato essere presente in 2 copie (M. Mazzara, JRC, *personal communication*).

METODI DI QUANTIFICAZIONE

Tra i metodi di quantificazione maggiormente utilizzati nell'analisi degli OGM in Real-time PCR ci sono:

- il metodo basato sul " ΔCt ";
- il metodo basato sulla "Curva standard".

Il metodo del " ΔCt " prevede l'utilizzo di DNA estratto da materiali di riferimento certificati Fluka a differenti percentuali di DNA transgenico, quali 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5% (w/w). Per ciascuno dei CRM impiegati si ricava il valore del " ΔCt " calcolando la differenza tra il Ct della curva di amplificazione del transgene ed il Ct della curva di amplificazione del gene endogeno. I valori di ΔCt e le relative percentuali di OGM (più precisamente il Log della %) costituiscono le coordinate (rispettivamente ordinata e ascissa) dei punti la cui retta interpolante costituisce la retta di calibrazione.

Mediante la retta di calibrazione, dal valore di ΔCt di un campione incognito si risale alla relativa % di OGM. Il metodo della "Curva standard" prevede l'utilizzo di DNA estratto da un determinato calibratore, sia esso standard Fluka o plasmide, diluito serialmente in 4 o 5 punti a concentrazione scalare aventi quantità di gene endogeno e transgene noti all'operatore. Le diluizioni più utilizzate sono 1:3; 1:4; 1:5. I Ct dei punti di diluizione del calibratore e i logaritmi decimali dei rispettivi numeri di copie geniche costituiscono le coordinate (rispettivamente ordinate e ascisse) dei punti la cui retta interpolante costituisce la retta di calibrazione. La stessa procedura viene impiegata per l'analisi del gene endogeno ed il transgene, per cui si ottengono 2 distinte rette di taratura, rispettivamente una per il gene endogeno ed una per il transgene.

Per quantificare infine la percentuale della componente transgenica in un campione incognito, innanzitutto si ricava il numero di copie geniche relative al gene endogeno e al transgene mediante interpolazione del *Ct* del campione incognito con la rispettiva retta di taratura. Quindi, viene calcolato il rapporto tra il numero di copie del transgene e il numero di copie del gene endogeno; il risultato viene moltiplicato per 100, ottenendo la percentuale della componente transgenica nel campione in esame.

In ogni analisi effettuata, accanto ai campioni incogniti si quantificano standard Fluka a percentuale nota di transgene (es. 1%; 0,5%, 1%, 2%, 5%), allo scopo di verificare su materiale certificato a composizione nota la correttezza della quantificazione e quindi la bontà dell'analisi.

Per ottenere una buona quantificazione è opportuno che il *range* dinamico (il *range* di *Ct* compreso tra il *Ct* del punto più concentrato ed il *Ct* di quello meno concentrato), sia per la retta di taratura del gene endogeno sia del transgene, comprenda al suo interno i *Ct* dei campioni incogniti e degli standard di riferimento utilizzati.

METODI DI RIVELAZIONE

I metodi di rivelazione utilizzati in Real-time PCR si possono suddividere in due gruppi, basati sull'impiego di:

- molecole fluorescenti che legano in modo aspecifico il DNA a doppio filamento;
- sonde sequenza-specifiche marcate con fluorofori.

Le molecole come il *Sybr green* sono altamente fluorescenti solo quando sono intercalate nella doppia elica di DNA, come mostrato in Figura 5. Quando il DNA è in stato di singolo filamento le molecole di *Sybr green* non si legano alle basi del DNA e la fluorescenza emessa è molto bassa. A seguito della polimerizzazione da parte della Taq polimerasi le molecole di *Sybr green* si trovano intercalate nel DNA a doppia elica. Maggiore è il numero di molecole di fluoroforo intercalate, maggiore è il segnale di fluorescenza. I vantaggi dell'utilizzo del *Sybr green* sono l'estrema versatilità (può essere utilizzato con qualunque coppia di primer e dunque per qualunque sequenza), l'economicità e l'intenso segnale di fluorescenza.

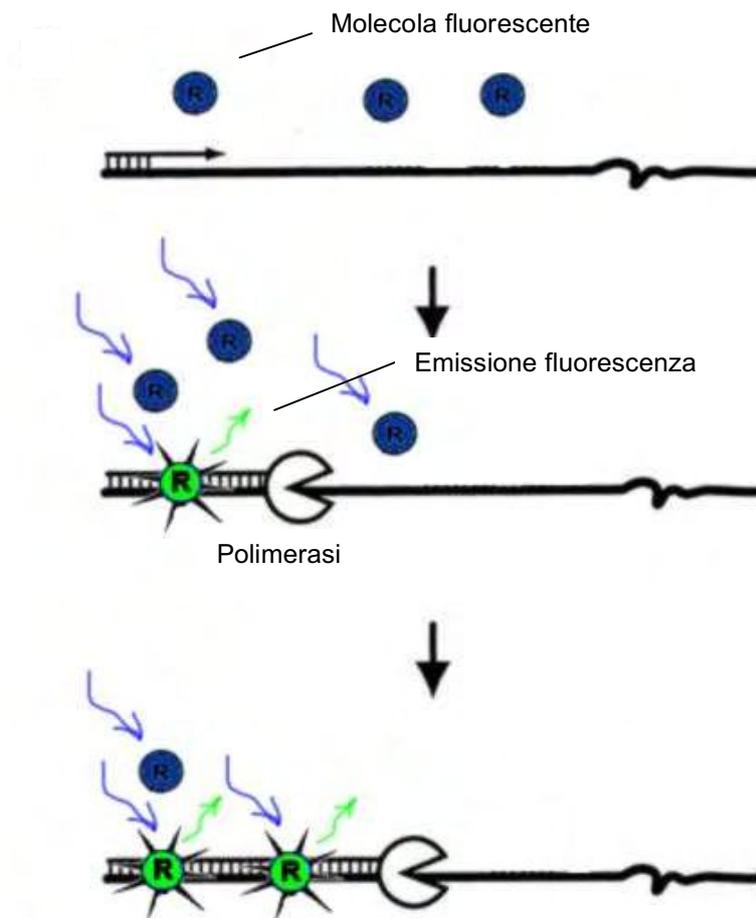


Figura 5 Funzionamento della sonda *Sybr Green*

Il metodo basato su *Sybr green* possiede tuttavia lo svantaggio di produrre un segnale non specifico poiché la molecola può legarsi anche a sequenze di DNA aspecifico, generando falsi positivi. L'ostacolo può essere parzialmente superato effettuando una curva di dissociazione (*melting curve*) al termine della corsa di PCR (Figura 6).

La curva di *melting* consiste in un aumento graduale della temperatura da 50 °C, condizione in cui tutto il DNA è a doppia elica e la fluorescenza è massima, a 94 °C, temperatura alla quale tutto il DNA è in forma dissociata e la fluorescenza è minima. Ogni frammento di DNA a doppia elica si dissocia ad una caratteristica temperatura, chiamata temperatura di *melting* (T_m), che è definita come la temperatura alla quale il 50% del DNA è in forma di singolo filamento.

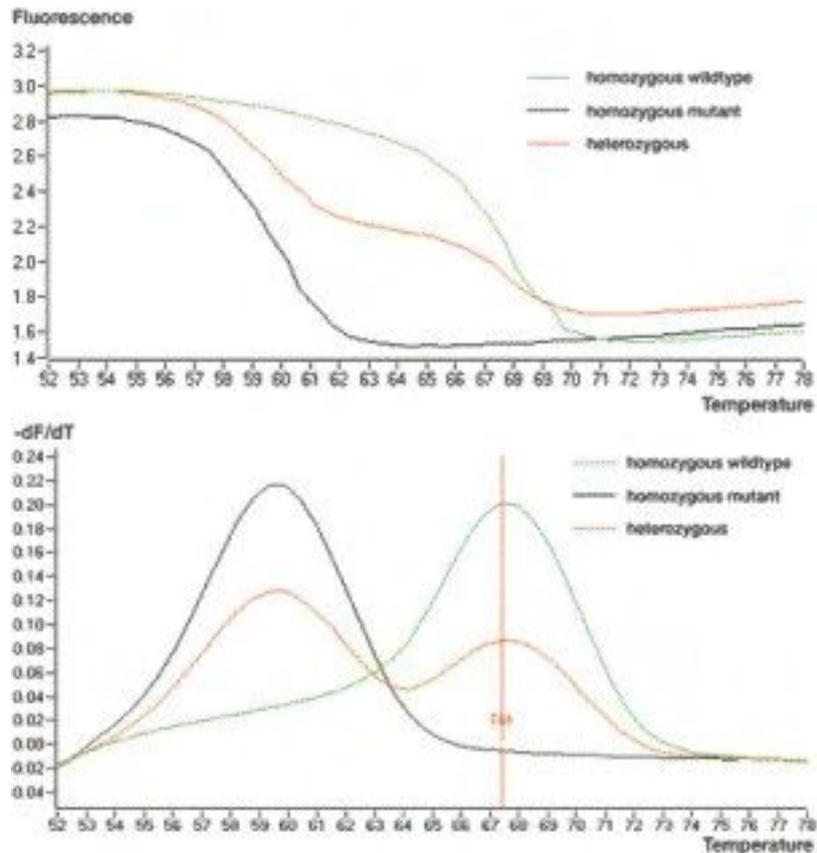


Figura 6 Esempi di curve di *melting*

Sopra: nell'asse delle ascisse è riportata la temperatura, in quello delle ordinate il segnale di fluorescenza

Sotto: nell'asse delle ascisse è riportata la temperatura, in quello delle ordinate la derivata prima del segnale di fluorescenza

Alla temperatura corrispondente alla T_m dei prodotti di PCR si noterà un flesso nella curva di *melting* e quindi si potrà valutare se durante la PCR si sono formati prodotti aspecifici o secondari. Se i flessi di fluorescenza sono più di uno, si evince che nella reazione di PCR si sono formati amplificati aspecifici.

I flessi di fluorescenza, per comodità, vengono trasformati in picchi eseguendo la derivata prima della curva.

Esistono in commercio diversi *mix* di PCR contenenti *Sybr green* o in alternativa si può acquistare la soluzione pura di *Sybr green* e mettere a punto nel proprio laboratorio i saggi di PCR Real-time.

Le sonde sequenza-specifiche marcate con fluorofori assicurano invece la massima specificità di reazione, essendo complementari ad un tratto di DNA contenuto all'interno delle sequenze dei *primer*, ma di contro sono piuttosto costose.

Esistono diverse tipologie di sonde fluorescenti: le sonde *Taqman* e le sonde di ibridazione (di utilizzo più diffuso), le sonde *Molecular Beacon* e le *QuantiProbe*.

Le sonde Taqman sono oligonucleotidi a singolo filamento di circa 20-25 bp marcati al 5' con una molecola fluorescente detta "*reporter*" ed al 3' con una molecola detta "*quencher*" (Figura 7).

Nella fase di denaturazione a 94 °C, quando il DNA è a singolo filamento, il *quencher* assorbe la fluorescenza emessa dal *reporter*. Nella fase di appaiamento, i *primer* e la sonda si legano al tratto di DNA complementare. Quindi, nella fase di estensione, la Taq polimerasi a partire dal *primer* Fw trascrive l'elica complementare fino a che, giunta alla sonda, inizia a digerirla, un nucleotide alla volta, mediante attività esonucleasica.

Il *reporter*, legato al 5' del primo nucleotide viene così allontanato dal *quencher* ed il segnale di fluorescenza, non più schermato dal *quencher*, viene rilevato dallo strumento.

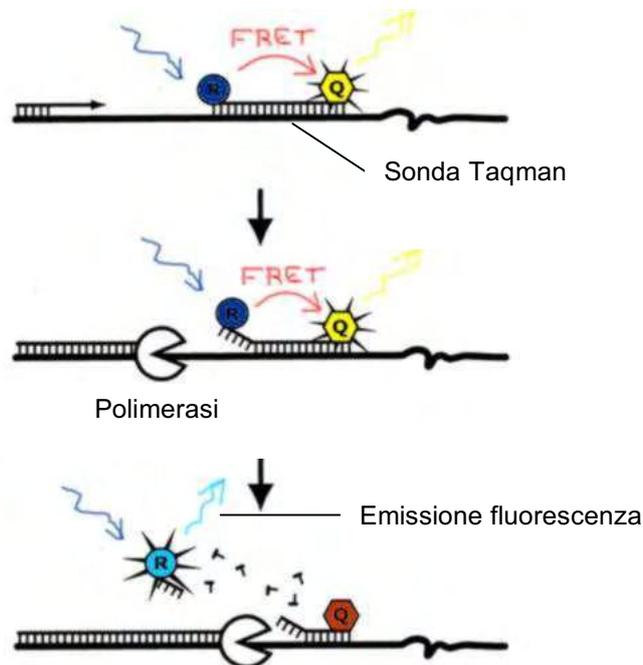


Figura 7 Funzionamento della sonda Taqman

Le sonde di ibridazione, invece, sono formate da una coppia di oligonucleotidi coniugati con una molecola fluorescente, disegnati in modo tale da legarsi sulla sequenza bersaglio ad una distanza di poche basi (Figura 8).

L'analisi che si avvale di questo tipo di sonde è basata sul trasferimento di energia di risonanza fluorescente (FRET) tra i due fluorofori, durante il quale un fluoroforo donatore, eccitato da una luce blu (LED), trasferisce la sua energia al fluoroforo accettore solo nel momento in cui si trova nelle sue immediate vicinanze. Il fluoroforo accettore emette luce ad una lunghezza d'onda superiore a quella del donatore, che viene rilevata dallo strumento in canali specifici.

Il principio FRET dipende infatti dalla vicinanza sterica dei due fluorofori. In assenza del bersaglio non avviene il trasferimento di energia. La quantità di coppie di sonde ibridate aumenta assieme al prodotto di PCR. Il segnale è proporzionale alla quantità di amplicone accumulato.

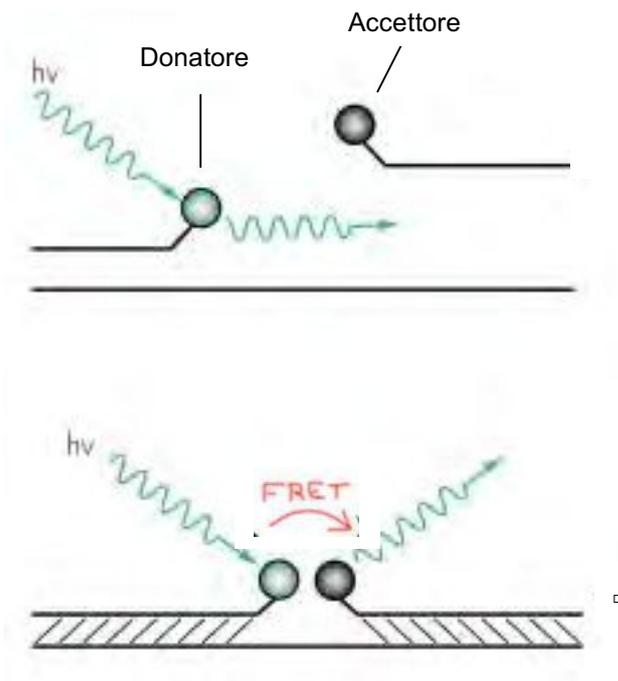


Figura 8 Funzionamento delle sonde FRET

UNITÀ DI MISURA

La Raccomandazione 787/2004/CE suggerisce di adottare il numero di copie di genoma aploide quale unità di misura per esprimere il quantitativo di analita rilevato nelle analisi di Real-time PCR e di conseguenza le misure di LOD (*Limit Of Detection*) e LOQ (*Limit Of Quantification*).

Questa unità di misura sembra dunque essere la più corretta ed è quindi auspicabile che venga adottata in tutto il territorio comunitario al fine di armonizzare il sistema.

ANALISI STATISTICA DI BASE

Un buon metodo analitico deve essere accurato e preciso e deve avere valori di LOD e LOQ più bassi possibile, come sotto discusso.

Accuratezza

L'accuratezza (vicinanza del valore osservato al valore atteso) si può calcolare secondo due modalità: una più semplice ed una più elaborata ma statisticamente robusta.

Per quanto riguarda la prima, è sufficiente calcolare la differenza tra valore osservato (misura di quantificazione in percentuale) e il valore atteso (percentuale nota), dividerla per il valore atteso e moltiplicarla per 100. Il valore ottenuto indica in quale "intorno" cade il valore osservato rispetto al valore atteso. Come riportato nel paragrafo iniziale, l'accuratezza viene considerata valida se il valore osservato cade all'interno del $\pm 25\%$ del valore atteso sull'intero *range* dinamico.

La seconda modalità di calcolo utilizza il test "*t*" di *Student*, test statistico che indica se un valore osservato è significativamente differente dal valore atteso. Per questo calcolo è necessario conoscere il valore di incertezza relativo alla preparazione del campione a percentuale nota di OGM. Questo valore risulta dalla somma di diversi fattori inerenti all'errore sistematico della misura di peso, al grado di umidità, all'omogeneità e alla purezza delle matrici. Come spiegato nel paragrafo relativo ai calibratori, il documento di certificazione allegato allo standard Fluka, riporta espressamente tale valore di incertezza sotto il nome di "*expanded uncertainty*".

Per poter calcolare una misura di accuratezza robusta, è necessario avere a disposizione almeno 4 misure di quantificazione per campione, ottenute quantificando in 2 sessioni di PCR differenti due estrazioni effettuate a partire dallo stesso campione.

La formula del “*t*” di *Student* è la seguente:

$$t = \frac{X_{\text{obs}} - X_{\text{exp}}}{\sqrt{(\text{errore standard}_{\text{obs}})^2 + \text{errore standard}_{\text{exp}}^2}}$$

dove:

- X_{obs} = media dei risultati di quantificazione
- X_{exp} = valore atteso
- **errore standard_{obs}** = deviazione standard_{obs}/radice quadrata del numero di misure effettuate
- **errore standard_{exp}** = valore di “*expanded uncertainty*” presente nel foglio allegato al CRM.

Esempio di calcolo dell’accuratezza nel caso di quantificazione dello standard Fluka 2% GM per cui siano state quantificate in Real-time PCR 6 percentuali (es. 1,6%, 1,8%, 2,1%, 2,3%, 2,07%, 2,4%).

- $X_{\text{obs}} = 2,04$
- $X_{\text{exp}} = 2$
- **errore standard_{obs}** = 0,12
- **errore standard_{exp}** = 0,1
- “*t*” = 0,2

Il valore di “*t*” calcolato con la suddetta formula va confrontato con il valore di “*t*” tabulato (nelle tabelle presenti su qualunque manuale di statistica): se il valore di “*t*” calcolato risulta inferiore al tabulato, non vi è significativa differenza tra il valore atteso e il valore osservato e l’accuratezza viene in tal modo accertata.

Generalmente si adotta il valore di “*t*” al 95% di probabilità riferito allo specifico valore di gradi di libertà (ν = numero di misure -1). Nel caso in esempio, $\nu = 5$ e “*t*”_{tab} = 2,02.

Poiché $t_{\text{sper}}(0,2) < t_{\text{tab}}(2,02)$ si può affermare che la quantificazione risulta accurata.

Precisione

La precisione può essere calcolata sia su standard di riferimento sia su campioni reali. Anche per questo parametro è consigliabile contare su almeno 4 misure ottenute quantificando in due sessioni di PCR due estrazioni dello stesso campione. Sulle misure ottenute si calcola la media, la deviazione standard e la “*Repeatability standard deviation*” (o coefficiente di variazione, *RSDr*), che in base ai requisiti citati nel paragrafo iniziale dovrebbe essere al di sotto del 25% su tutto il “*range dinamico*”.

Determinazione di LOD e LOQ

I limiti LOD e LOQ rappresentano la più piccola quantità di analita che può essere rispettivamente rilevata e quantificata in funzione del metodo analitico impiegato. Solitamente questi parametri sono espressi in valore assoluto, ossia come il numero più basso di copie che possono essere rispettivamente rilevate o quantificate 95 volte su 100. Accanto, essi possono anche essere espressi come valori relativi o pratici, come segue:

- valore relativo: rappresenta la percentuale più bassa di OGM che può essere rispettivamente rilevata o quantificata. Il calcolo di questa percentuale deriva dal rapporto tra il valore assoluto e il massimo numero di copie di gene endogeno rilevabili o quantificabili;
- valore pratico: rappresenta la percentuale più bassa di OGM che può essere rilevata o quantificata in relazione ad uno specifico campione. Il calcolo di questa percentuale deriva dal rapporto tra il valore assoluto e il massimo numero di copie di gene endogeno rilevabili o quantificabili in quello specifico campione.

In base alle linee guida proposte dall'ENGL (paragrafo iniziale), per il calcolo dei valori di LOD e LOQ assoluti, è necessario diluire il DNA che si intende analizzare a concentrazioni decrescenti fino a che il gene target sia presente in pochissime copie (per esempio tra 3 e 10). Ogni diluizione deve essere quantificata in 5 o 6 replicati in modo da poter calcolare il rispettivo valore di *RSDr*: i numeri di copie quantificati con valori di *RSDr* pari a 33% e a 25% corrispondono rispettivamente ai valori di LOD e LOQ.

CAPITOLO 8

ESERCITAZIONE PRATICA: ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA SU MANGIMI

Lorenza Dalla Costa, Chiara Nobili, Lucia Martinelli

INTRODUZIONE

Questo capitolo, nel riportare l'esempio concreto di un'esperienza analitica specifica, vuole cimentare chi legge in un'esercitazione a verifica della parte teorica. L'obiettivo dell'esercitazione proposta è quello di effettuare un'analisi qualitativa completa su campioni di mangime reali presso due laboratori distinti, mettendo a confronto i risultati ottenuti in due contesti, in cui un medesimo protocollo viene svolto ad opera di personale e strumentazioni diversi. Sono prese in esame tutte le fasi dell'analisi: l'estrazione del DNA, l'analisi qualitativa con PCR *end-point*, l'analisi quantitativa con Real-time PCR e l'elaborazione statistica dei dati ottenuti.

Inoltre, viene esaminata la possibilità di utilizzare i calibratori plasmidici, da impiegare per la costruzione della retta di taratura.

Il capitolo è pertanto concepito come una traccia di analisi, anche da proporre nella fase di formazione di personale specializzato. Riteniamo utile focalizzare alcuni aspetti salienti per condurre un confronto all'interno di gruppi di discussione, come trattato nella sezione finale dello stesso.

PROTOCOLLI

Strumentazione principale impiegata nelle analisi

- Spettrofotometro: uguale nei due laboratori (BioPhotometer eppendorf)
- Termociclatore per PCR *end point*: TGRADIENT thermocycler (Biometra) nel *Laboratorio 1* e Gene Amp PCR system 2400 (PERKIN ELMER) nel *Laboratorio 2*.
- Termociclatore per Real-time PCR: iCycler (Biorad) nel *Laboratorio 1* e LightCycler (Roche) nel *Laboratorio 2*

Campioni

- Mangime: 6 campioni incogniti reperibili in commercio a diversa composizione.
- CRM a percentuali note di transgene: standard Fluka 410S 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5% per la soia e standard Fluka 411R 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5% per il mais.
- Campioni *ad hoc*: soia RR 0,8% e mais Bt-176 3% (d'ora in poi definiti "standard *ad hoc*", abbreviato in "std *ah*") preparati in laboratorio a partire da standard Fluka.

Per la preparazione dello "std *ah*" soia RR 0,8% miscelare 320 mg di standard Fluka di soia RR 1% con 80 mg di standard Fluka di soia RR 0%.

Per la preparazione dello "std *ah*" 3% Bt-176 miscelare 198 mg di standard Fluka di mais Bt-176 2% con 102 mg di standard Fluka di mais Bt-176 5%.

Eventi analizzati e loro costrutti

Gli eventi analizzati sono: soia Round-up Ready prodotta da Monsanto (Figura 9), mais Bt-176 prodotto da Syngenta (Figura 10), mais Mon-810 prodotto da Monsanto (Figura 11), mais Bt-11 prodotto da Syngenta (Figura 12), mais T-25 prodotto da Bayer (Figura 13).

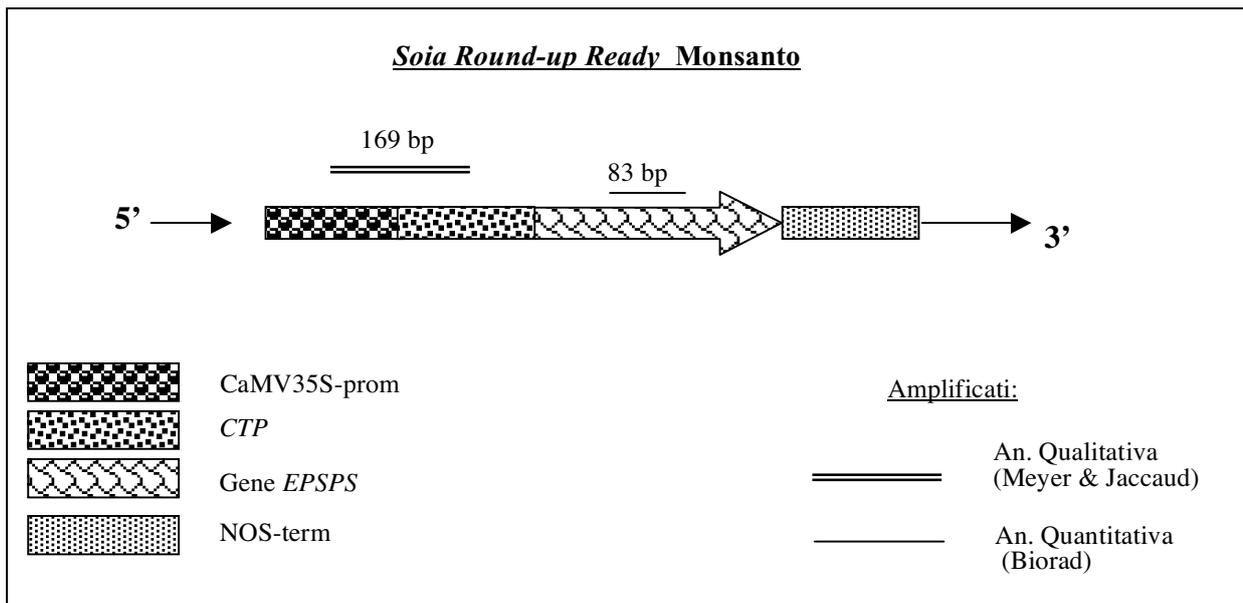


Figura 9 Rappresentazione schematica della soia *Round-up Ready*

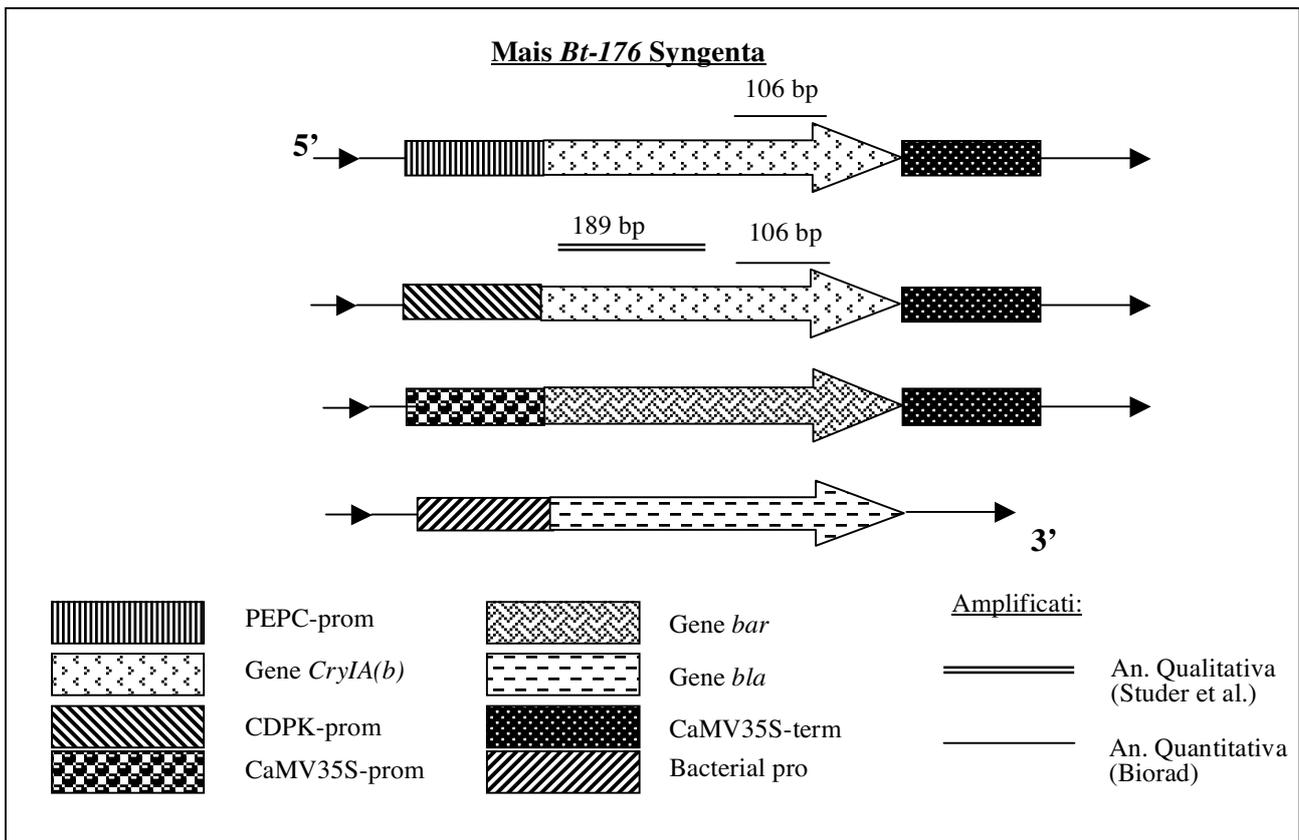


Figura 10 Rappresentazione schematica del mais Bt-176

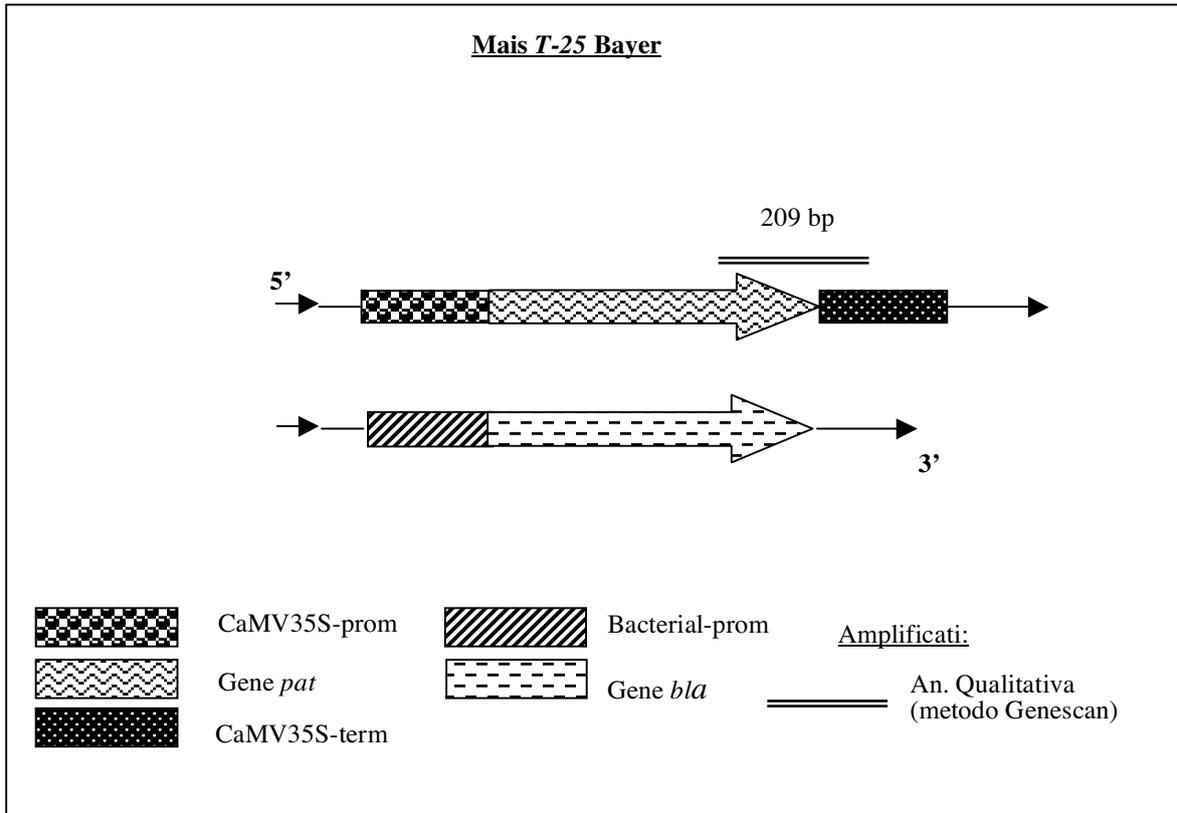


Figura 13 Rappresentazione schematica del mais T-25

Estrazione di DNA genomico da mangimi a varia composizione con il metodo CTAB

- Ridurre il campione ad una sottile polvere (un frullatore dedicato può essere adatto);
- Porre 100-200 mg del polverizzato in eppendorf sterile da 1,5 ml;
- Aggiungere 750 µl di CTAB a pH8 extraction buffer (20 g/l CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1 M TRIS/HCl, 20 mM Na-EDTA) e mescolare bene.

Si segnala che per i campioni contenenti soia o girasole vanno anche aggiunti 500 µl di esano al fine di rimuovere la componente lipidica.

- Incubare 30 min a 65 °C;
- Centrifugare per 10 min a 16.000 rpm;
- Trasferire il surnatante in una nuova provetta pulita

Si segnala che se è presente l'esano è necessario fare attenzione a non asportare la fase lipofila al sopra della fase acquosa;

- Aggiungere 5 μ l di RNase A (10 mg/ml) ed attendere 30 min a T° ambiente;
- Aggiungere 200 μ l di cloroformio e mescolare per 30 sec invertendo la provetta;
- Centrifugare per 10 min a 16.000 rpm (finché le fasi risultino separate);
- Trasferire la fase acquosa in una nuova provetta;
- Aggiungere 2 volumi di CTAB precipitation solution (5 g/l CTAB, 0,04 M NaCl) e mescolare bene;
- Incubare per 60 min a T° ambiente;
- Centrifugare per 10 min a 16.000 rpm ed eliminare il surnatante;
- Risospendere il precipitato in 350 μ l di 1,2 M NaCl;
- Aggiungere 350 μ l di cloroformio e mescolare per 30 sec;
- Centrifugare per 10 min a 16.000 rpm (finché le fasi risultino separate) e trasferire la fase acquosa (superiore) in una nuova provetta;
- Aggiungere 0,8 volumi di isopropanolo, mescolare ed incubare per 30 min a -20 °C;
- Centrifugare 30 min a 16.000 rpm ed eliminare il surnatante;
- Aggiungere al pellet 500 μ l di 70% etanolo e mescolare bene;
- Centrifugare per 15 min a 16.000 rpm e rimuovere il surnatante;
- Far asciugare il DNA all'aria e risospendere il pellet nel volume desiderato di acqua nucleasi free o buffer.

Misura della concentrazione e della purezza del DNA allo spettrofotometro

Analizzare la concentrazione del DNA estratto allo spettrofotometro misurando l'assorbanza a 260 nm, considerando che l'assorbanza di 1 OD è equivalente a circa 50 mg/ml di DNA a doppia elica e a circa 37 mg/ml di DNA a singola elica.

Per la verifica della purezza del DNA estratto analizzare sia il rapporto delle assorbanze a 260 nm e 280 nm ($A_{260/280}$) che dà indicazioni sulla presenza di proteine contaminanti (le proteine assorbono a 280 nm), sia il rapporto delle assorbanze a 260 nm e 230 nm ($A_{260/230}$) che dà indicazioni sulla presenza di sostanze quali carboidrati, fenoli, peptici e composti aromatici. Ricordiamo che un DNA puro dovrebbe avere un rapporto ($A_{260/280}$) di circa 1,8 ed un rapporto ($A_{260/230}$) intorno a 2,2.

Preparazione del gel per l'elettroforesi

Per verificare lo stato di degradazione del DNA genomico estratto, utilizzare un gel di agarosio all'1,5%, mentre per la corsa elettroforetica degli amplificati di PCR utilizzare un gel di agarosio al 2%.

Come buffer di elettroforesi utilizzare TBE 0,5 X (45 mM TRIS-borato, 1 mM EDTA a pH 8) o TAE 1X (40 mM TRIS-acetato e 1 mM EDTA a pH 8) e come "gel loading buffer 6X" una soluzione acquosa costituita da 0,25% (w/v) di blu di bromofenolo, 0,25% (w/v) di xylene cyanol FF e 30% (v/v) di glicerolo.

Impostare il voltaggio di corsa del gel su 100 V.

Nel nostro esempio, nel *Laboratorio 1* il gel è colorato con Sybr Gold 10X (Molecular Probes), mentre nel *Laboratorio 2* è impiegata una soluzione di Etidio bromuro 10 mg/ml (1 µl di EtBr in 20 ml di gel).

Analisi qualitativa: PCR end-point

Allestire le reazioni di PCR in un volume finale di 50 µl nelle condizioni mostrate in Tabella 4, utilizzando 0,025 U/µl di AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), ciascun *primer* alla concentrazione di 0,5 µM (Tabella 5), ciascun dNTP (Applied Biosystems) alla concentrazione di 200 µM, MgCl₂ (Applied Biosystems) alla concentrazione di 2 mM in un buffer di reazione 1X (Applied Biosystems).

Reagenti	Concentrazioni stock iniziale	Concentrazioni in mastermix	Volume di reazione (µl)
Campione di DNA		10 ng/µl	10
AmpliTaq-Gold Polymerase	5U/µl	0,025 U/µl	0,25
Buffer (senza Mg ²⁺)	10X	1X	5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	4
4 dNTP	10 mM	200 µM	1
Primer Fw	25 µM	0,5 µM	1
Primer Rv	25 µM	0,5 µM	1
H ₂ O ultrafiltrata			27,75
Volume finale(µl)			50

Tabella 4 Composizione della "Master Mix" per l'analisi qualitativa *end point*

Sequenza genica	Sequenza primer	Bp	Note e riferimenti
CaMV35S*	Fw: 5' GCT-CCT-ACA-AAT-GCC-ATCA 3' Rv: 5' GAT-AGT-GGG-ATT-GTG-CGT-CA 3'	195 bp	Pietsch <i>et al.</i> 1997
Lectina	Fw: 5' GCC-CTC-TAC-TCC-ACC-CCC-ATC-C 3' Rv: 5' GCC-CAT-CTG-CAA-GCC-TTT-TTG-TG 3'	118 bp	Meyer <i>et al.</i> 1996
CaMV35S* - CTP	Fw: 5' ATC-CCA-CTA-TCC-TTC-GCA-AGA 3' Rv: 5' TGG-GGT-TTA-TGG-AAA-TTG-GAA 3'	169 bp	Detection di soia RR Meyer & Jaccaud 1997
Zeina	Fw: 5' AGT-GCG-ACC-CAT-ATT-CCA-G 3' Rv: 5' GAC-ATT-GTG-GCA-TCA-TCA-TTT 3'	277 bp	Studer <i>et al.</i> 1997
Cry1A(b)	Fw: 5' CTC-TCG-CCG-TTC-ATG-TCC-GT 3' Rv: 5' GGT-CAG-GCT-CAG-GCT-GAT-GT 3'	211 bp	Detection di mais Bt-176 Metodo Genescan
IVS2 – PAT	Fw: 5' CTG-GGA-GGC-CAA-GGT-ATC-TAA-T 3' Rv: 5' GCT-GCT-GTA-GCT-GGC-CTA-ATC-T 3'	189 bp	Detection di mais Bt-11 Metodo Genescan
CaMV35S** - PAT	Fw: 5' ATG-GTG-GAT-GGC-ATG-ATG-TTG 3' Rv: 5' TGA-GCG-AAA-CCC-TAT-AAG-AAC-CC 3'	209 bp	Detection di mais T-25 Metodo Genescan
CaMV35S** - S.G.	Fw: 5' TCG-AAG-GAC-GAA-GGA-CTC-TAA-CG ₃ ' Rv: 5' TCC-ATC-TTT-GGG-ACC-ACT-GTC-G ₃ '	170 bp	Detection di mais Mon-810 Metodo Genescan

Tabella 5 *Primer impiegati nell'analisi PCR end-point*

CaMV35S* = promotore del virus 35S del Mosaico del Cavolfiore; CTP = sequenza genica di petunia; IVS = introne; CaMV35S** = terminatore del virus 35S del Mosaico del Cavolfiore; S.G. = sequenza genomica fiancheggiante il T-DNA

Il protocollo termico prevede: una denaturazione iniziale a 95 °C per 9 min; 40 cicli di amplificazione rispettivamente costituiti da denaturazione a 95 °C per 30 sec, appaiamento alla temperatura specifica per ciascuna sequenza amplificata (i.e. 58 °C per il promotore CaMV35S; 60 °C per il gene zeina e la sequenza esogena di soia RR; 63 °C per il gene lectina e le sequenze esogene di Bt-176, Bt-11 e Mon 810; 64 °C per la sequenza esogena del T-25) per 30 s ed estensione a 72 °C per 60 s; una estensione finale a 72 °C per 3 min; ed un raffreddamento a 6 °C.

Analisi quantitativa: Real-time PCR

Può risultare interessante, al fine del paragone di due realtà laboratoriali distinte, mettere a confronto due strumenti differenti. Nel nostro esempio, le analisi quantitative in Real-time PCR sono state svolte con le strumentazioni mostrate in Figura 14.



A



B

Figura 14 Due strumentazioni comunemente impiegate per l'analisi Real-time PCR

A: "iCycler" (Biorad), in dotazione presso il *Laboratorio 1*

B: "LightCycler" (Roche) in dotazione presso il *Laboratorio 2*

Va sottolineato che i due strumenti prevedono l'uso di protocolli termici e mix di PCR specifici, mentre il set di *primer* e sonda (Tabella 6) e il metodo di quantificazione (metodo basato sulla *Curva standard*) impiegati sono gli stessi.

Se viene utilizzato lo strumento "iCycler" (Biorad):

- allestire le reazioni di PCR in un volume finale di reazione di 25 μ l contenente "Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG" 1X (Invitrogen), ciascun *primer* alla concentrazione di 0,3 μ M e la sonda Taqman marcata al 5' con il fluoroforo FAM e al 3' con il fluoroforo TAMRA alla concentrazione di 0,2 μ M come schematizzato in Tabella 7;
- utilizzare il seguente protocollo termico: 50 °C per 2 minuti per la decontaminazione operata dall'UDG (Uracile DNA Glicosilasi) contenuta nella Platinum SuperMix, 50 cicli di amplificazione a 95 °C per 15 sec, per la fase di denaturazione, seguiti da 60 °C per 1 min, per la fase di appaiamento/estensione. Il segnale della fluorescenza della sonda Taqman viene rilevato durante la fase di appaiamento/estensione (60 °C).

Gene	Sequenza primer	Bp	Note e riferimenti
lectina	Fw: 5' CGG-CAC-CCC-AAA-ACC-C 3' Rv: 5' GCT-ACC-GGT-TTC-TTT-GTC-CCA 3' Probe: FAM ^{5'} CTC-TTG-GTC-GCG-CCC-TCT-ACT-CCA-C 3'---TAMRA	79 bp	Biorad
CTP EPSPS	Fw: 5' GCC-ATG-TTG-TTA-ATT-TGT-GCC-AT 3' Rv: 5' GAA-GTT-CAT-TTC-ATT-TGG-AGA-GGA-C 3' Probe: FAM ---5' CTT-GAA-AGA-TCT-GCT-AGA-GTC-AGC-TTG-TCA-GCG 3'---TAMRA	83 bp	Quantification di soia RR prEN-ISO Draft 21570
zeina	Fw: 5' TCA-TGT-TAG-GCG-TCA-TCA-TCT-GT 3' Rv: 5' TGC-AGC-AAC-TGT-TGG-CCT-TA 3' Probe: FAM--- 5' CAT-CAC-TGG-CAT-CGT-CTG-AAG-CGG 3'---TAMRA	72 bp	Biorad
ADH	Fw: 5' CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC 3' Rv: 5' CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC 3' Probe: FAM--- 5' AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA 3'---TAMRA	136 bp	"Validation report" dell'evento Bt-11, CRL.
Cry1A(b)	Fw: 5' CCC-ATC-GAC-ATC-AGC-CTG-AGC 3' Rv: 5' GGC-CGA-AGA-TGC-CCC-AGA-T 3'* Probe: FAM---5' ATG-TCC-ACC-AGG-CCC-AGC-ACG 3'---TAMRA	106 bp	Quantification di mais Bt-176 prEN-ISO Draft 21570

Tabella 6 *Primer e probe impiegati nell'analisi Real-time PCR*

CTP = sequenza genica di petunia; * il primer Rv utilizzato per Cry1Ab è stato disegnato da noi con il programma "Primer 3" (disponibile in rete) in quanto quello indicato nel prEN-ISO 21570 ha mostrato un'inadeguata capacità di discriminazione a basso numero di copie geniche

Reagenti	Concentrazioni stock iniziale	Concentrazioni in mastermix	Volume di reazione (µl)
Campione di DNA		10 ng/µl	5
Platinum PCR Supermix	1X	1X	12,5
Primer Fw	3 µM	0,3 µM	2,5
Primer Rv	3 µM	0,3 µM	2,5
Sonda Taqman	2 µM	0,2 µM	2,5
Volume finale(µl)			25

Tabella 7 *Condizioni di amplificazione utilizzate nel Laboratorio 1*

Se viene utilizzato lo strumento “LightCycler” (Roche):

- allestire le reazioni di PCR in un volume finale di reazione di 20 µl contenente LightCycler – FastStart DNA Master Hybridization Probes 1X (Roche), 0,2 U di Uracile-DNA Glicosilasi (Roche), MgCl₂ 2,5 mM, ciascun primer alla concentrazione di 0,5 µM, la sonda Taqman marcata al 5’ con il fluoroforo FAM e al 3’ con il fluoroforo TAMRA alla concentrazione di 0,2 µM come schematizzato in Tabella 8.

Reagenti	Concentrazioni stock iniziale	Concentrazioni in mastermix	Volume di reazione (µl)
Campione di DNA		10 ng/µl	5
Light Cycler mix	10 X	1X	2
UDG	1 U/µl	0,2 U	0,2
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2
Primer Fw	5 µM	0,5 µM	2
Primer Rv	5 µM	0,5 µM	2
Sonda Taqman	2 µM	0,2 µM	2
Volume finale(µl)			20

Tabella 8 Condizioni di amplificazione del Laboratorio 2

- Utilizzare il seguente protocollo termico: 30 °C per 8 min per la decontaminazione operata dall’UDG, 55 cicli a 95 °C per 5 sec seguiti da 60 °C per 15 sec e da 72 °C per 8 sec rispettivamente per le fasi di denaturazione, appaiamento ed estensione. È seguita una fase di raffreddamento a 40 °C per 30 sec. Il segnale della fluorescenza della sonda Taqman è rilevato al termine della fase di appaiamento (60 °C).

Quantificazione

Il metodo di quantificazione da noi utilizzato per l’analisi in Real-time PCR è quello basato sulla curva standard.

Per quanto riguarda i calibratori, sono impiegati sia farine CRM (Fluka) sia plasmidi. Le curve standard di calibrazione sono ottenute a partire da cinque punti a concentrazione decrescente (diluizione seriale 1:3 o 1:5) di DNA estratto da farine Fluka al 2% o al 5% di transgene (per quanto riguarda i CRM) o di DNA plasmidico.

Accanto ai campioni incogniti vengono quantificati anche standard Fluka a percentuale nota di OGM (0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5%) per la verifica della validità della quantificazione. In ogni corsa di PCR gli standard ed i campioni sono analizzati in triplicato per ottenere una migliore affidabilità nel calcolo del ciclo soglia.

Per ogni campione vengono quantificate due estrazioni indipendenti di DNA in due sessioni di Real-time PCR. Questo schema di quantificazione viene ripetuto due volte, variando il calibratore utilizzato per le curve standard: i CRM nel primo caso e i plasmidi nel secondo.

Per quantificare la percentuale della componente transgenica (% OGM) nel campione vengono quantificati i numeri di copie geniche relative al gene endogeno e al transgene; quindi viene calcolato il rapporto tra il numero di copie di transgene e il numero di copie del gene endogeno; il risultato di questo rapporto viene moltiplicato per 100, ottenendo la percentuale della componente transgenica.

$$\frac{\text{Copie transgene}}{\text{Copie gene endogeno}} \times 100 = \% \text{ OGM}$$

Preparazione dei calibratori plasmidici

I plasmidi da produrre “in laboratorio” contengono una sequenza (*amplicone ibrido*, da Pardigol *et al.*, 2003) comprendente un tratto di gene endogeno ed un tratto di transgene adiacenti, come descritto nel Capitolo 7. Per la soia RR si impiegano i tratti del gene endogeno *lectina* e del transgene *epsps*, mentre per il mais Bt-176 quelli del gene endogeno *zeina* e del transgene *cry1Ab*.

La loro preparazione prevede le seguenti tre fasi:

- fase 1: tratti specifici di gene endogeno e transgene sono amplificati separatamente utilizzando una specifica coppia di primer;
- fase 2: i due frammenti vengono assemblati per formare l’“amplicone ibrido”;
- fase 3: l’amplicone ibrido viene clonato in un vettore plasmidico.

Fase 1

Allestire le reazioni di PCR in un volume finale di 25 μ l, utilizzando 0,625 unità di *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems), 0,5 μ M di ciascun primer (Tabella 9, P1- P2 e P3-P4), 200 μ M di ciascun dNTP, 2 mM $MgCl_2$ e 100 ng di DNA (estratto da farina di soia e da farina di mais). Il protocollo termico prevede una fase di denaturazione iniziale a 95 °C per 9 min, 45 cicli di denaturazione, appaiamento ed estensione rispettivamente a 95 °C per 30 sec, 58 °C per 30 sec e 72 °C per 30 sec e un'estensione finale a 72 °C per 5 min. Un'aliquota dei prodotti di PCR va analizzata su gel di agarosio 2%.

Fase 2

Allestire le reazioni di PCR per assemblare i due tratti (Figura 15) in un volume finale di 25 μ l, utilizzando 0,625 unità di *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems), 0,3 μ M di ciascun *primer* (Tabella 9, P1 e P4), 200 μ M di ciascun dNTP e 0,2 μ l dei due prodotti di PCR precedentemente amplificati. Il protocollo termico utilizzato prevede una denaturazione iniziale a 95 °C per 9 min, 45 cicli di denaturazione, appaiamento ed estensione rispettivamente a 95 °C per 30 s, 58 °C per 30 s e 72 °C per 30 s ed una estensione finale a 72 °C per 5 min. Un aliquota del prodotto di PCR va quantificata su un gel di agarosio 2% mediante DNA lambda (BioLabs) a concentrazione nota.

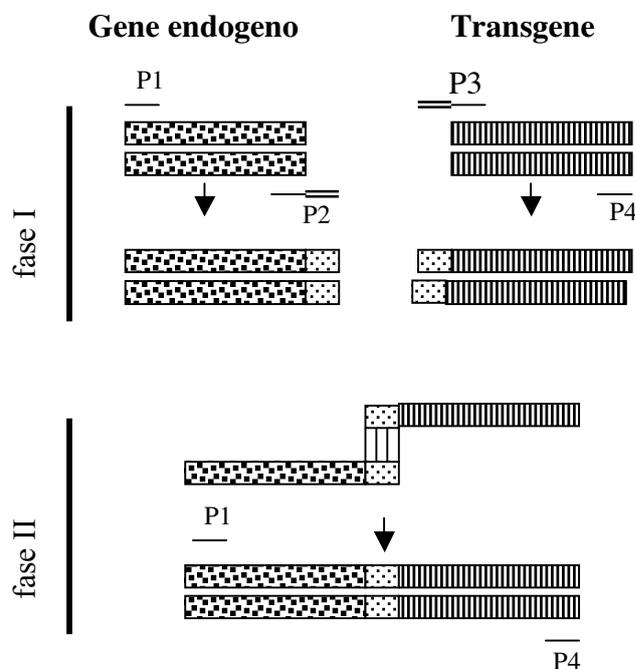


Figura 15 Schema di costruzione dell'amplicone ibrido: fasi 1 e 2

	Gene endogeno	Transgene
Soia	lectina	EPSPS
	P1(fw):cagttgagctcgacgcattaaacggcacccccaaaa cc P2(rv): gcgaagctggcaacgcta	P3(fw):gccatgttgtaattgtgccat P4(rv):aatgctgagctcaactgtgaagtcatttcattggaga ggac
Mais	zeina	Cry1Ab
	P1(fw):tgcagcaactgttggcctta P2(rv):aatgctgagctcaactgttcatgttaggcgtcatcat ctgt	P3(fw):acagttgagctcgacgcattcccatcgacatcagcctg agc P4(rv):caggaaggcgtcccactggc

Tabella 9 **Primer utilizzati per la costruzione degli ampliconi ibridi rispettivamente per soia e mais**
 I 20 nucleotidi sporgenti al 5' segnalati in tabella in neretto sono tra loro complementari e consentono l'ibridazione dei due tratti che si vogliono inserire in tandem nei plasmidi

Fase 3

Gli “ampliconi ibridi” preparati per la soia RR e per il mais Bt-176 vengono clonati nel vettore pGEM-T Easy vector (Promega) (Figura 16), usando la T4 DNA ligase (Promega) ed adottando un rapporto molare inserto:vettore pari a 3:1 ed un tempo di incubazione di 16 h a 4 °C.

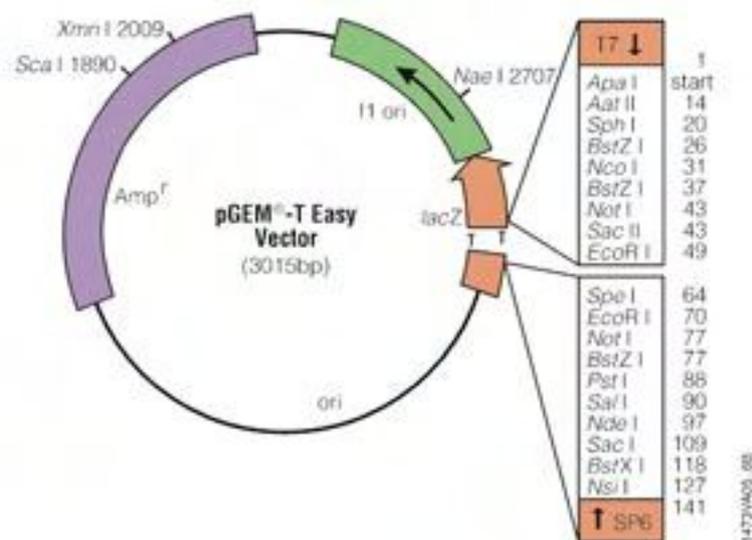


Figura 16 Schema del plasmide pGEM-T easy

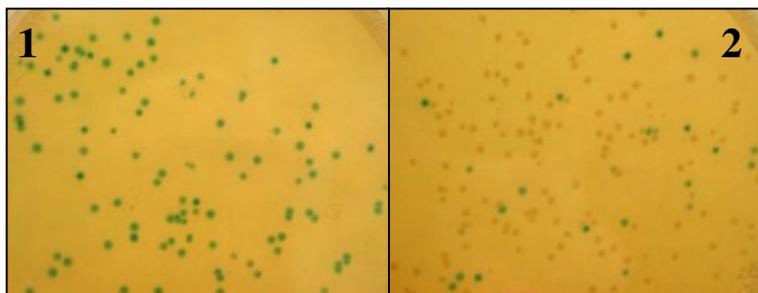


Figura 17 Colonie di *E. coli* JM-109 cresciute su terreno contenente X-gal in seguito a “trasformazione” con il plasmide pGEM-T + inserto
1 = controllo negativo di trasformazione (solo colonie blu);
2 = colonie “trasformate” con il plasmide con inserto (bianche) e colonie con plasmide senza inserto (blu)

Il prodotto della reazione di ligasi (mix di plasmidi che hanno o non hanno incorporato l’inserto) è impiegato per la “trasformazione” dei batteri *E.coli* JM109 (Figura 17), in accordo alla descrizione del manuale tecnico Promega.

L’esito della “trasformazione” dei batteri con il plasmide pGEM-T viene evidenziato mediante il sistema colorimetrico “blu-bianco” secondo cui vengono selezionate le colonie: le colonie batteriche che hanno inglobato il plasmide contenente la sequenza di interesse, nel nostro caso l’amplicone ibrido (colonie positive), presentano colorazione bianca; le colonie che hanno assunto il plasmide senza la sequenza di interesse (negative) presentano colorazione blu.

Dalle colonie positive (bianche), mediante il Kit QIAprep^R Spin Miniprep Kit (Qiagen), i plasmidi pGEM-T contenenti l’inserto vengono estratti, purificati, eluiti in 100 µl di nuclease-free water (Promega) e sequenziati per avere conferma della corretta sequenza dei frammenti inseriti. Questi plasmidi saranno utilizzati quali calibratori per le analisi in Real-time PCR.

La concentrazione delle soluzioni contenenti i calibratori plasmidici viene misurata allo spettrofotometro e ne viene calcolata la molarità mediante la tabella del “nomogramma” per DNA a doppia elica presente nel manuale Sambrook e Russel (2001); i calibratori plasmidici sono infine diluiti alla concentrazione di 10^8 copie/µl in TE buffer, suddivisi in aliquote da 100 µl e conservati a -20 °C.

RISULTATI

Riportiamo quale riferimento per la discussione i risultati delle analisi effettuate nei due laboratori, seguendo i protocolli sopra descritti.



Segnaliamo con il seguente simbolo alcune problematiche interessanti su cui focalizzare l'attenzione: la discussione di queste sarà ulteriormente approfondita nella sezione finale.

Estrazione di DNA genomico da mangimi a varia composizione con il metodo CTAB

Ciascun campione di mangime e ciascun standard Fluka è stato estratto due volte. In entrambi i laboratori le concentrazioni misurate allo spettrofotometro sono risultate comprese nell'intervallo 200 - 400 ng/ μ l e i valori dei rapporti di assorbanza ($A_{260/280}$) e ($A_{260/230}$) hanno evidenziato assenza di sostanze contaminanti.

In aggiunta al dato spettrofotometrico, la concentrazione e la qualità del DNA sono state valutate anche mediante visualizzazione su gel di agarosio, come mostrato in Figura 18.



In base al confronto con il DNA a concentrazione nota sono state stimate concentrazioni comprese tra 50 e 200 ng/ μ l, dunque leggermente inferiori ai valori ottenuti allo spettrofotometro.



Inoltre, la qualità del DNA estratto è risultata differente tra campione e campione, e talvolta anche all'interno dello stesso campione (campione 1 e 4 nelle due estrazioni indipendenti di DNA) come evidenziato dalla presenza di “*smear*” (strisciate di DNA lungo la direzione della corsa elettroforetica) che denotano livelli differenti di degradazione.

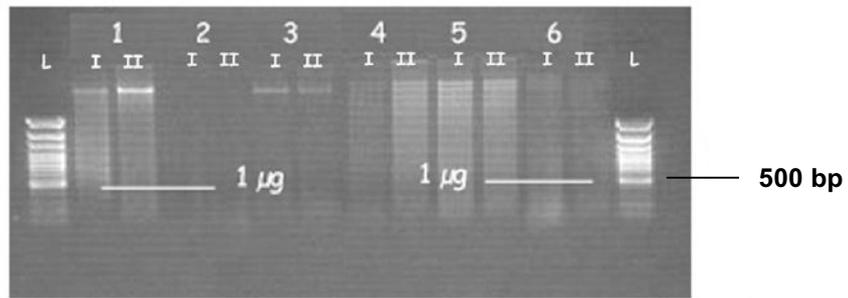


Figura 18 Verifica dell'estrazione del DNA genomico da sei campioni di mangime
 Gel di elettroforesi del DNA genomico estratto dai 6 campioni di mangime.
 I e II: replicati di estrazione; L: ladder di riferimento a concentrazione nota, dove
 la banda relativa al frammento di 500 bp corrisponde a 1 µg

Analisi qualitativa: PCR *end-point*

Questo saggio sul DNA estratto dai 6 campioni incogniti di mangime (Figura 19) vuole verificare innanzitutto la presenza del promotore CaMV35S, comune a tutti gli eventi GM presi in considerazione.

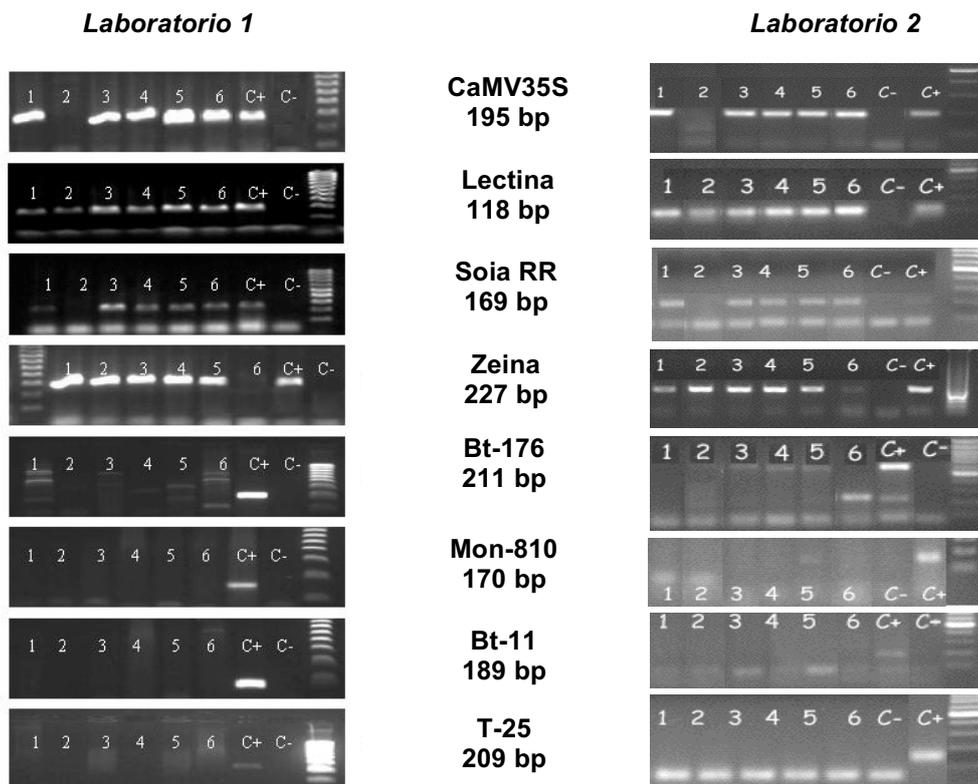


Figura 19 Risultati dell'analisi qualitativa su gel di agarosio al 2%

Poi, in caso di positività, saranno da verificare la presenza di soia (mediante il gene endogeno per la lectina) e del relativo evento GM (soia RR) e di mais (mediante il gene endogeno per la zeina) e dei relativi eventi GM (mais Bt-176, mais Mon-810, mais Bt-11 e mais T-25).

In accordo alla Figura 19 (sintetizzata nella Tabella 10), i campioni 1, 3, 4, 5 sono risultati positivi ai geni endogeni di soia e mais e all'evento soia RR, mentre non sono state rilevate positività per gli altri eventi GM ricercati.

Il campione 6 è risultato positivo al gene endogeno di soia, lectina, e al transgene di soia RR, mentre sembra non contenere né mais né eventi GM del mais.

Il campione 2, pur dimostrando di contenere sia mais sia soia è risultato negativo a tutti gli eventi GM analizzati.

Inoltre, è stata ottenuta una buona *performance* di amplificazione per tutte le sequenze analizzate.

Sequenze amplificate	Campioni											
	1		2		3		4		5		6	
	lab 1	lab 2	lab 1	lab 2	lab 1	lab 2	lab 1	lab 2	lab 1	lab 2	lab 1	lab 2
CaMV35S	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Lectina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Soia RR	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Zeina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Bt-176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mon-810	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bt-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 10 Sintesi dei risultati dell'analisi qualitativa in Real-time PCR

- 3  Tuttavia, nel saggio del *Laboratorio 1*, per quanto riguarda l'evento di mais Bt-176, l'amplificazione mostra la presenza di prodotti aspecifici (taglia molecolare diversa dall'attesa e di lieve intensità).

Analisi quantitativa: Real-time PCR

I campioni di mangime risultati positivi all'analisi della PCR *end-point*, vengono analizzati in Real-time PCR per la quantificazione degli eventi GM di soia RR identificati (campioni 1, 3, 4, 5, 6). Il campione 2 non è stato sottoposto ad analisi quantitativa in quanto risultato non contenere eventi GM nella PCR end point. Inoltre, dette analisi vengono effettuate anche sul preparato "std *ah*" soia RR 0,8% con lo scopo di valutare la capacità dei due laboratori di quantificare percentuali di transgene minime, il più vicino possibile alla soglia di tolleranza prevista dalla legge, per quanto riguarda la soia RR. Per quanto riguarda invece il mais, nessun campione di mangime è risultato contenere mais GM. Per questo, la verifica della performance di quantificazione è stata effettuata sullo "std *ah*" mais Bt-176 3%.

Nel nostro esempio le analisi quantitative vengono effettuate paragonando due diversi sistemi di calibrazione, già illustrati nella sezione dei protocolli, che rispettivamente impiegano gli standard CRM ed i plasmidi ("*tandem marker plasmid*").

Per quanto riguarda il gene endogeno per la quantificazione di soia RR è stato scelto il gene per la lectina 1, in quanto ha dimostrato possedere caratteristiche ottimali per questo tipo di analisi ed è il gene di norma impiegato dalla maggior parte dei laboratori, come già illustrato nel capitolo 7.

Per il mais, inizialmente è stato utilizzato il gene per la zeina.

- 4  Tuttavia, poiché per questo gene abbiamo riscontrato problemi di amplificazione, successivamente è stato scelto in alternativa il gene endogeno alcool deidrogenasi, con cui è stato analizzato lo "std *ah*" mais Bt-176 3%.

La Tabella 11 riporta i risultati delle prove di quantificazione ottenuti presso i due laboratori. Per ciascun campione è riportato il valore medio della percentuale di transgene (m%) calcolato sulla media di 4 misure di quantificazione (due estrazioni analizzate in due PCR) e lo scarto tipo relativo (coefficiente di variazione, RSDr).

Quantificazione di soia RR									
Calibratore: standard Fluka					Calibratore: plasmide				
Campioni	Laboratorio 1		Laboratorio 2		Laboratorio 1		Laboratorio 2		
	m%	RDSr	m%	RSDr	m%	RDSr	m%	RSDr	
1	97	16	401	22	56	13	30	31	
3	69	22	117	22	32	14	12	24	
4	4,7	19	12	36	3,6	11	2,6	47	
5	8,6	25	18	17	6,2	11	3,7	10	
6	1,1	41	1,8	17	0,57	29	0,51	14	
std ah 0,8% soia RR	0,86	10	6,9	8,6	0,78	12	0,90	92	
Quantificazione di mais Bt-176									
std ah 3% mais Bt 176	3,9	9,9	4,2	5,1					

Tabella 11 Risultati dell'analisi quantitativa con i due sistemi di calibrazione

RSDr = scarto tipo relativo di ripetibilità o coefficiente di variazione espresso in percentuale

5  Le principali osservazioni che si possono trarre dai dati della Tabella 16 sono le seguenti:

- in alcuni casi, con lo standard Fluka quale calibratore vengono quantificate percentuali di OGM superiori al 100% (campioni: 1 e 3 nel *Laboratorio 2*);
- le percentuali di OGM calcolate con il calibratore plasmidico sono risultate sempre inferiori a quelle calcolate con lo standard Fluka, in entrambi i laboratori, ma soprattutto nel *Laboratorio 2* dove vi è la maggior discrepanza tra le misure.

Analisi statistica dei dati di quantificazione

Riportiamo di seguito un esempio di analisi statistica che è stata impiegata per valutare i risultati ottenuti nell'esercitazione, con riferimento ai “*Minimum Performance Requirements*” suggeriti da ENGL già esposti nel Capitolo 7.

Accuratezza

Per i campioni preparati *ad hoc* in laboratorio (“std ah” 0,8% soia RR e “std ah” 3% mais Bt-176) si può calcolare l’accuratezza della misura, applicando la formula (già anticipata nel Capitolo 7) secondo cui si calcola la differenza tra il valore osservato e il valore atteso, la si divide per il valore atteso e la si moltiplica per 100:

$$[(\text{valore osservato}-\text{valore atteso})/\text{valore atteso}] \times 100.$$

Se il valore ottenuto da questo calcolo è minore di 25%, l’accuratezza può essere considerata buona.

La Tabella 12 mostra che i valori di accuratezza delle misure di quantificazione relativi al campione “std ah” soia RR 0,8% ottenute con il sistema plasmidico sono adeguati per entrambi i laboratori, mentre la quantificazione con gli standard Fluka presenta un’accuratezza soddisfacente solo per il *Laboratorio 1*. Per quanto riguarda lo “std ah” mais Bt-176 3% i valori di accuratezza superano, anche se di poco, la soglia del 25%, essendo le misure di quantificazione ottenute in entrambi i laboratori leggermente più alte del valore atteso 3% (3,9% e 4,2% in Tabella 12 rispettivamente per il *Laboratorio 1* e il *Laboratorio 2*). Questo risultato di sovrastima può essere attribuito ad errori che accompagnano la preparazione “artigianale” degli standard.

Per quanto riguarda il calcolo dell’accuratezza basato sul “t” di Student, non è possibile eseguirlo, poiché non possiamo avere il dato dell’errore standard di riferimento connesso alla preparazione dello standard *ad hoc*, come invece si avrebbe nel caso di materiale certificato (*expanded uncertainty*, vedi Capitolo 7).

	Calibratore: standard Fluka		Calibratore: plasmide	
	Laboratorio 1	Laboratorio 2	Laboratorio 1	Laboratorio 2
std ah soia RR 0,8%	7,5%	> 100%	2,5%	12,5%
std ah mais Bt 176 3%	30%	40%		

Tabella 12 Risultati del calcolo dell’accuratezza con i due sistemi di calibrazione

Precisione

Per quanto riguarda questo parametro, i risultati ottenuti in entrambi i laboratori (Tabella 16) sono buoni, poiché il valore di RSDr ottenuto per la maggior parte dei campioni risulta inferiore a 25%.

Concordanza tra i risultati dei due laboratori

La valutazione di questo aspetto può essere effettuata con il test del “t” di Student, che paragona due medie inferendo sulla loro differenza significativa (Capitolo. 7). Nel nostro caso, la media delle percentuali di quantificazione (m%) ottenuta dal *Laboratorio 1* viene confrontata con quella ottenuta dal *Laboratorio 2* per tutti i campioni esaminati mediante il test del “t” di Student (Tabella 13).

Quantificazione di soia RR						
Campioni	Calibratore: standard Fluka			Calibratore: plasmidi		
	<i>Laboratorio 1</i>	<i>Laboratorio 2</i>	“t”	<i>Laboratorio 1</i>	<i>Laboratorio 2</i>	“t”
	m%	m%		m%	m%	
1	97	401	6,6	56	30	4,2
3	69	117	3,2	32	12	11
4	4,7	12	3,3	3,6	2,6	1,5*
5	8,6	18	5,1	6,2	3,7	6,4
6	1,1	1,8	2,7	0,57	0,51	0,65*
std ah 0,8% soia RR	0,86	6,9	20	0,78	0,90	0,9*
Quantificazione di mais Bt-176						
std ah 3% mais Bt 176	3,9	4,20	1,4*			

Tabella 13 **Esame della concordanza tra i risultati di quantificazione con i due sistemi di calibrazione**

* = valori del “t” di Student risultati inferiori al valore tabulato di t.95 per 3 gradi di libertà (4 misure – 1) che è pari a 2,35

Per l'interpretazione dei dati, ricordiamo che quando il valore di "t" ottenuto risulta maggiore del valore tabulato, si può affermare che le due misure sono differenti. Mentre, se il valore di "t" ottenuto risulta inferiore al valore tabulato, si può affermare che non c'è differenza significativa tra le due misure confrontate. In generale il valore di "t" che viene preso in considerazione è quello di $t_{.95}$ ($P < 0,05$, risultato significativo) che nel nostro caso risulta pari a 2,35.

In accordo alla Tabella 13, utilizzando lo standard Fluka quale calibratore, solamente lo "std *ah*" Bt-176 3% non viene quantificato in modo significativamente differente dai due laboratori. Invece, impiegando il calibratore plasmidico, non si hanno quantificazioni significativamente differenti per i campioni 4, 6 e std *ah* soia RR 0,8%.



Il test del "t" di Student dimostra che tra i risultati di quantificazione ottenuti dai due laboratori con entrambi i sistemi di calibrazione non vi è sempre una concordanza ottimale. Va però anche segnalato che il calibratore plasmidico ha consentito di ottenere risultati più affini tra i due laboratori.

GUIDA ALLA VALUTAZIONE DEI RISULTATI NEI GRUPPI DI DISCUSSIONE

Questa sezione rappresenta una guida per impostare un'analisi critica dei saggi proposti nell'esercitazione pratica. Vengono discusse le problematiche più interessanti che riguardano le varie fasi dell'analisi proposta nell'esercitazione e le possibili soluzioni adottate, allo scopo di fornire spunti per lo sviluppo di ulteriori riflessioni da parte del lettore e dell'eventuale gruppo di discussione.

Legenda



Problematica



Discussione

Estrazione di DNA genomico

- 1  ***Differenza tra le misure di concentrazione del DNA***
La concentrazione del DNA genomico misurata allo spettrofotometro è risultata diversa da quella stimata su gel di agarosio sulla base di un confronto con un DNA a quantità nota.

I due saggi possono dare risultati differenti, tuttavia i due metodi possono essere considerati complementari per quanto segue. 

La misura allo spettrofotometro può sovrastimare l'effettiva concentrazione del DNA e non dare informazioni sul suo livello di degradazione. Tuttavia, questo saggio ha il pregio di poter valutare la purezza del DNA mediante i rapporti delle assorbanze $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ (come descritto nel paragrafo protocolli). Invece, la visualizzazione del DNA su gel di agarosio, mentre consente di verificare il tasso di degradazione del DNA e di determinarne la relativa concentrazione sulla base di un confronto visivo con un DNA a quantità nota, non dà indicazioni riguardo alla presenza di eventuali sostanze contaminanti che potrebbero inibire la reazione di PCR.

Per la misura della concentrazione del DNA è quindi consigliabile cautelarsi mediante l'impiego di entrambi i metodi descritti.

- 2  **Degradazione del DNA**
Alcuni campioni analizzati presentano DNA piuttosto degradato, come visibile nella Figura 18.

Le matrici dell'esempio sono mangimi che nelle fasi di preparazione del prodotto finito possono essere stati sottoposti a trattamenti termici e meccanici. Questi possono influire sulla degradazione del DNA in misura maggiore rispetto al processo di estrazione. 

Va ricordato (come già discusso nel Capitolo 5) che matrici molto processate solitamente consentono di estrarre poco DNA e per di più molto degradato.

Per questo, sono da sperimentare per le differenti matrici protocolli di estrazione mirati. Inoltre, quantitativi maggiori di matrice da cui estrarre il DNA possono essere una buona soluzione a questo problema.

Analisi qualitativa: PCR *end-point*

Nell'insieme, i risultati dell'analisi qualitativa ottenuti nei due laboratori sono risultati tra loro concordanti.

- 3  **Prodotti di amplificazione aspecifici**
La PCR qualitativa per l'evento mais Bt-176 effettuata dal Laboratorio 1 (Figura 19) mostra la presenza di prodotti di amplificazione aspecifici.

Per ottenere un risultato privo di ambiguità, i campioni possono essere analizzati mediante Real-time PCR senza la costruzione di una curva standard, poiché questo rappresenta un sistema più specifico rispetto alla PCR *end point*. 

Esso, infatti, prevede l'impiego, oltre ai *primer*, anche di una sonda di 20 nucleotidi complementare ad un tratto interno dell'amplificato che assicura la massima specificità di riconoscimento della sequenza desiderata, limitando in maniera considerevole il fenomeno di prodotti di amplificazione aspecifici.

Nell'esempio in questione, essa ha dimostrato l'assenza di amplificazione del frammento esogeno di Bt-176 per tutti i campioni esaminati (non mostrato).

Analisi quantitativa: Real-time PCR

L'analisi quantitativa, essendo anche la fase più complessa di tutto il saggio, ha messo in luce diversi punti critici.

- 4  **Scelta del gene endogeno di riferimento più adatto**
Il sistema di primer e sonda per il gene zeina utilizzato inizialmente ha dato problemi di amplificazione per cui si è voluto saggiare un gene endogeno di riferimento alternativo.

Come già discusso nel capitolo 7, per il mais sono stati validati i seguenti sistemi di geni endogeni: zeina, alcool deidrogenasi, invertasi e *high mobility group protein gene* (Hernandez, 2004). 

Nel caso presentato, il gene per l'alcohol dehydrogenase con il relativo sistema di primer e sonda consigliati dal CRL (Tabella 6) ha consentito di ottenere una buona performance di amplificazione.

- 5  **Risultati di quantificazione apparentemente anomali.**
Per alcuni campioni, con gli standard Fluka quali calibratori, sono state calcolate percentuali di quantificazione superiori al 100%.

Con il plasmide quale calibratore, invece, le percentuali di quantificazione per gli stessi campioni sono risultate notevolmente più basse rientrando al di sotto del 100%. 

In più, in generale, confrontando le misure di quantificazione ottenute con i due diversi sistemi di calibrazione si nota che in entrambi i laboratori i valori calcolati con lo standard Fluka risultano sempre maggiori rispetto a quelli corrispondenti ottenuti con il plasmide, in particolare quando sono quantificate elevate percentuali di transgene (Tabella 11). Per ovviare a questo problema e riuscire a valutare con più precisione elevate percentuali di OGM impiegando gli standard Fluka a basse percentuali (es. 1% o 2%), si consiglia di estendere il più possibile il *range dinamico* di quantificazione, passando ad esempio da una diluizione scalare del calibratore 1:3 ad una 1:5 o 1:6 (Capitolo 7).

In generale, si suggerisce di impiegare inizialmente una scala di diluizione del calibratore ampia e successivamente, nel caso di ulteriori analisi di conferma, di adeguare la diluizione in modo più mirato ai campioni in esame.

- 6  **Bassa concordanza tra i risultati dei due laboratori**
Alcuni dei risultati di quantificazione erano tra loro molto diversi come verificato con il test del “t” di Student (Tabella 13).

L’analisi in Real-time PCR è una tecnica molto sensibile che presenta spesso una notevole variabilità nei risultati analitici prodotti da laboratori diversi, in quanto coinvolge molteplici fattori che influenzano i risultati prodotti  (Capitolo 7).

Inoltre, nel caso in esame, sono state impiegate apparecchiature differenti per Real-time PCR, che – pur nelle medesime condizioni di reazione (protocolli e reagenti) – hanno *performance* di quantificazione diverse. In più, operatori diversi rappresentano un ulteriore fattore di variabilità.

CAPITOLO 9

BIBLIOGRAFIA

Chiara Nobili e Lorenza Dalla Costa

- Anklam E. *et al.* (1999), **'The validation of methods based on PCR for the detection of GMO in Food'** *Analytica Chimica Acta* 393: 177-179.
- Bailey M.A. & Kaeppler H. F. (2001), **'Workshop presentations from the 2000 World Congress on In Vitro biology'** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 37:101-102.
- Bassoli R. (2002), **'Scienziati in piazza'** *Il Messaggero* 14.02.2002.
- Bertheau Y. *et al.* (2002), **'Detection methods and performance criteria for genetically modified organism'** *J. AOAC Int.* 85: 801-808.
- Beyer P. *et al.* (2002), **'Golden Rice: Introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency'** *The Journal of Nutrition* 132:506S-510S.
- Block A. & Schwarz G. (2003), **'Validation of different genomic and cloned DNA calibration standards for construct-specific quantification of LibertyLink in rapeseed'** *Eur. Food Res. Technol.* 216: 421-427.
- Bredahl L. (2001), **'Determinants of consumer attitudes and purchase intentions with regards to genetically modified foods: results of cross-national survey'** *Journal of Consumer Policy* 24: 23-61.
- Bucchi M. (2004), **'Science in Society. An introduction to social studies of science'** *London, Routledge.*

- Carlsson F. *et al.* (2004), **‘Consumer benefits of labels and bans of genetically modified food – An empirical analysis using choice experiments’** *Working Papers in Economics no. 129/2004, Department of Economics, Ghotenburg University*
URL:
<<http://www.handels.gu.se/epc/archive/00003449/01/gunwpe0129.pdf>>
- CEN (2001), **‘Detection of Genetically Modified Organism and Derived Products-Sampling’** *CEN/TC275/WG11 N111 Draft Jan. 2001. European Committee for Standardisation, Brussels.*
- Consensus Document (2006), **‘Coesistenza tra colture tradizionali, biologiche e geneticamente modificate’** 15 marzo 2006 *URL:*
<<http://www.consigliodirittigenetici.org/new/displaynews.php?id=157>>
- Daley M. *et al.* (1998), **‘Co-transformation with one Agrobacterium tumefaciens strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants’** *Plant Cell Rep.* 17:489-496.
- Dalla Costa & Martinelli (2007), **‘Development of a Real-Time PCR Method Based on Duplo Target Plasmids for Determining an Unexpected Genetically Modified Soybean Intermix with Feed Components’** *Journal of Agricultural and Food Chemistry Published on Web 01/20/2007*
- Dulbecco R. (2001), **‘Perché sbaglia chi vuole abolire la ricerca genetica’** *La Repubblica 10.02.2001.*
- Ebinuma H. & Komamine A. (2001), **‘MAT (Multi-Auto-Transformation) vector system. The oncogenes of Agrobacterium as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants’** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:103-113.

European Commission (1998), '**Commission Directive 98/53/EC of 16 July 1998 laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs**' *Official Journal of the European Communities* L201, 93-101. URL: http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/1998/l_201/l_20119980717en00930101.pdf.

European Commission (2006), '**Community register of GM food and feed**' URL: http://www.europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm.

European Parliament and Council, Regulation EC no. 178/2002 laying down **the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety.**

FAO/WHO (2002), '**Proposed Draft General Guidelines on Sampling (CX/MAS02/3)** Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, Codex Alimentarius Commission, Food and Agricultural Organisation, Rome. URL: ftp://ftp.fao.org/codex/ccmas24/ma02_03e.pdf.

Fischer R. *et al.* (2003), '**Production of antibodies in plants and their use for global health**' *Vaccine* 21: 820-825.

Fishkin J.S. (2000), '**The "Filter", the "Mirror" and the "Mob": Reflections on deliberative democracy**', paper presented at the Conference **Deliberating about deliberative democracy**' February, 4-6, 2000, Austin, University of Texas URL: <http://www.la.utexas.edu/conf2000/papers/FilterMirrorMob.pdf>.

- Gachet E. *et al.* (1998), '**Detection of GMOs by PCR; a brief review of methodologies available**' *Trends in food science & Technology* 9: 380-388.
- Gaskell G. *et al.* (2004), '**GM foods and the misperception of risk perception**' *Risk Analysis* 24: 185-194.
- Goldsbrough A.P. *et al.* (1993), '**Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato**' *Bio/Technol.* 11:1286-1292.
- Greco P. (2005), '**Il Modello Venezia. La comunicazione nell'era post accademica della scienza**'
URL: <<http://ics.sissa.it/conferences/csIntroduzione.pdf>>.
- Habermas J. (1989), '**A theory of communicative action**' vols. 1&2, Cambridge Policy Press.
- Haldrup A. *et al.* (2001), '**Plant selection principle based on xylose isomerase**' *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:114-119.
- Hathcock J. N. (2000), '**The Precautionary Principle – An impossible burden of proof for new products**' *AgBioForum* 3: 255-258.
- Hernandez M. *et al.* (2004), '**Development and Comparison of Four Real-Time Polymerase Chain Reaction System for Specific Detection and Quantification of Zea mays**' *J Agric. Food Chem.* 52: 4632-4637.
- Holmberg N. *et al.* (1997), '**Transgenic tobacco expressing *Vitroescilla* haemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production**' *Nature Biotech.* 15:244-247.
- Hoss M. & Paabo S. (1993), '**DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method**' *Nucl. Ac. Res.* 21: 3913-3914.

- Holst-Jensen A. *et al.* (2003), '**PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs)**' *Analytical Bioanalytical Chemistry* 375: 985-993.
- Huang J. *et al.* (2000), '**Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA**' *Biotechniques* 28: 432-434.
- Hubner P. *et al.* (2001), '**Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food**' *J AOAC Int.* 84: 1855-1864.
- Iamtham S. & Day A. (2000), '**Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids**' *Nature Biotechnol.* 18:1172-1176.
- ISAAA International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (2005), '**Global Status of Biotech/GM crops in 2005**' *ISAAA Briefs 34/2005*
URL: <<http://www.isaaa.org/kc/bin/briefs34/es/index.htm>>.
- ISO (1990), '**Oilseeds-Sampling**' *ISO 542 International Organisation for Standardisation, Geneva.*
- ISO (1999), '**Cereals, Pulses and Milled Products-Sampling of Static Batches**' *ISO 13690. International Organisation for Standardisation, Geneva.*
- ISTA (2003), '**International Rules for Seed Testing**' *International Seed Testing Association, Bassersdorf.*
- Kay S. & Paoletti C. (2002), '**Sampling Strategies for GMO Detection and/or Quantification**' (Rev. 4.2) *EUR 20239 EN. Joint Research Centre, European Commission, Ispra*
URL:<http://biotech.jrc.it/doc/EuroReport_sampling_strategies.pdf>.

- Klimyuk V. I. *et al.* (1993), '**Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis**' *Plant Journal* 3: 493-494.
- Komari T. *et al.* (1996), '**Vectors carrying two separate T-DNAs for cotransformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers**' *The Plant J.* 10:165-174.
- Kuribara H. *et al.* (2002), '**Novel Reference Molecules for Quantification of Genetically Modified Maize and Soybean**' *Journal of AOAC International* 85:1077-1089.
- Laukens K. *et al.* (2004), '**Construction of a two-dimensional gel electrophoresis protein database for the Nicotiana tabacum cv. Bright Yellow-2 cell suspension culture**' *Proteomics* 4: 720–727.
- Lipp M. *et al.* (1998), '**IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder**' *Journal of AOAC International* 82: 923-928.
- Ma J. *et al.* (2005), '**Plant-derived pharmaceuticals – The road forward**' *Trends in Plant Science* 12: 580-585.
- Ma S.-W. *et al.* (1997), '**Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance**' *Nature Medicine* 3: 793-796.
- Marin F. & Martinelli L. (2005), '**Strumenti per l'interpretazione delle attitudini dei consumatori all'acquisto di prodotti geneticamente modificati**' *Economia e Diritto Agroalimentare* 2: 37-49.
- Martinelli L. (2004), '**Ogm e accettabilità. Riflessioni sulla comunicazione**' *Nuovo Diritto Agrario* 3: 69-76.

- Martinelli L. *et al.* (2005), '**Genetically modified food and feed: traceability and labeling in the public debate**' *Proceedings of the 9th ICABR International Conference on Agricultural Biotechnology: ten years later, July 6-10, 2005, Ravello, Italy* URL: http://www.economia.uniroma2.it/conferenze/icabr2005/papers/Martinelli_et_al_PAPER_ICABR2005.pdf.
- Mason H. S. *et al.* (2002), '**Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine**' *Trends in Mol. Medic.* 8: 324-329.
- Mattarucchi E. *et al.* (2005), '**Development and applications of Real-time PCR standards for GMOP quantification based on tandem-marker plasmid**' *Eur. Food Res. Technol.* 221: 511-519.
- Meyer R. *et al.* (1996), '**Polymerase chain reaction in the quality and assurance of food: detection of soya in processed meat products**' *Z. Lebensm Unters Forsch.* 203:339-344.
- Meyer R. & Jaccaud E. (1997), '**Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybean**' *Proceeding of the EURO FOOD CHEM IX conference, Inerlaken, Schweiz.*
- Miraglia M. *et al.* (2004), '**Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain**' *Food and Chemical Toxicology* 42:1157-1180.
- Miraglia M. *et al.* (1998), '**Safety Assessment of Genetically Modified Food Products: An Evaluation of Developed Approaches and Methodologies**' *Microchemical Journal* 59: 154-159.

- Paoletti C. & Mazzara M. (2005), **'Definition of minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing'** *European Network of GMO Laboratories (ENGL)*.
URL:<<http://gmo-crl.jrc.it/doc/Method%20requirements.pdf>>.
- Pardigol A. *et al.* (2003), **'A simple procedure for quantification of genetically modified organism using hybrid amplicon standards'** *Eur. Food Res. Technol.* 216: 412-420.
- Pettit P. (2001), **'Deliberative Democracy and the Discursive dilemma'** *Philosophical Issues* vol. 11/2001.
- Pietsch K. *et al.* (1997), **'Screeningverfahren zur identifizierung "gentechnisch veränderter" pflanzlicher lebensmittel'** *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 93: 35-38.
- Pinstrup-Andersen P. (1999), **'Agricultural Biotechnology, trade, and the developing countries'** *AgBioForum* 2: 215-217.
- Reed J. *et al.* (2001), **'Phosphomannose isomerase: An efficient selectable marker for plant transformation'** *In Vitro Cell. Dev. Biol.Plant* 37:127-132.
- Rigby D. *et al.* (2004), **'Consumer willingness to pay to reduce GMOs in food and increase the robustness of GM labelling'** *Report to Department of the Environment, Food and Rural Affairs, University of Manchester*, URL: <http://www.defra.gov.uk/environment/gm/research/pdf/epg_1-5-213.pdf>.
- Richter L.J. *et al.* (2000), **'Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization'** *Nature Biotechnol.* 18: 1167-1171.

- Sambrook J. & Russel D.W. (2001), '**Molecular cloning-a laboratory manual, third edition**' *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001.*
- Sandman P.M. (1999), '**Risk = Hazard + Outrage: Coping with controversy about utility risks**' *Engineering News Record, October 4: A19-A23.*
- Spoel P. (2004), '**The meaning and ethics of Informed Choice in Canadian Midwifery**'
 URL :<<http://www.inter-disciplinary.net/mso/hid/hid3/spoel%20paper.pdf>.
- Steiner J.J. *et al.* (1995), '**A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses**' *Nucleic Acids Res. 23: 2569-70.*
- Studer E. *et al.* (1997), '**Nachweis des gentechnisch veränderten "Maximizer" – Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**' *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 88: 515-524.*
- Studer E. *et al.* (1998), '**Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize**' *Z. lebensm Unter Forsch A. 207: 207-213.*
- Sugita K. *et al.* (1999), '**Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing**' *Plant Cell Rep. 18:941-947.*
- Swiss Food Manual (1998), **Schweizerisches Lebensmittelbuch.** *Bundesamt für Gesundheit, Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern. Switzerland.*

- Taylor J. I. *et al.* (2000), '**Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA**' *J. of Chromatog. A* 89: 159-166.
- Taverniers I. *et al.* (2004), '**Cloned plasmid DNA fragments as calibrators for controlling GMOs: different Real-time duplex quantitative PCR methods**' *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 1198-1207.
- Tonge R. *et al.* (2001), '**Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology**' *Proteomics* 1: 377-396.
- USDA/GIPSA (2000), '**Sampling and Testing Recommendations for the Detection of Cry9C Protein in Hybrid Seed Corn**' *Grain Inspection, Packers, and Stockyards Administration, U.S. Department of Agriculture, Washington DC.* URL: <http://www.usda.gov/gipsa/biotech/starlink/cry9cdetection.htm>.
- USDA/GIPSA (2001) '**Testing for Starlink™ Corn-Lateral Flow Test Strip Method**' *Directive 9181.1, Grain Inspection, Packers, and Stockyards Administration, U.S. Department of Agriculture, Washington DC.* URL: <http://www.usda.gov/gipsa/reference-library/directives/9181-1.pdf>.
- Van Dujin G. *et al.* (2002), '**Detection of GMO in foods by protein- and DNA-based techniques: bridging the methods**' *J. AOAC Int.* 85:787-791.
- Walmsley A. M. *et al.* (2003), '**Plant cell factories and mucosal vaccines**' *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 145-50.
- Walsh P.S. *et al.* (1991), '**Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material**' *BioTechniques* 10:506-513.

Zhang G. & Weiner J. H. (2000), '**CTAB-mediated purification of PCR products**' *BioTechniques* 29: 982-986.

Zimmermann A. *et al.* (1998), '**Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples**' *Z. Lebensm Unter Forsh A.* 207: 81-90.

Zubko E. *et al.* (2000), '**Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes**' *Nature Biotechnol.* 18: 442-445.

Zuo J. *et al.* (2001), '**Chemical regulated, site specific DNA excision in transgenic plants**' *Nature Biotechnol.* 19: 157-161.

CAPITOLO 10

RASSEGNA SITI WEB DI RIFERIMENTO

Chiara Nobili

Siti WEB di maggiore rilevanza

<http://www.apat.it>

Agenzia per la Protezione dell’Ambiente e per i Servizi Tecnici

<http://sanita.it/biotec>

Sistema Informativo Sanitario

<http://www.isaaa.org>

sito informativo dell’ ‘International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications’

<http://www.jrc.cec.eu.int/>

sito informativo del “Joint Research Centre, organizzazione di ricerca che è parte integrante della Commissione Europea.

<http://www.agbios.com/main.php>

questo sito offre l’accesso ad un database riguardante: la biosicurezza di piante geneticamente modificate che hanno ricevuto una approvazione regolare, informazioni sull’integrazione dei sistemi di sicurezza e una libreria sulla biosicurezza, organizzata per argomenti.

http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gm_ff_applications/catindex_en.html

sito informativo dell’ “Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare”. L’EFSA fornisce consulenza scientifica obiettiva su tutte le questioni che abbiano un impatto diretto o indiretto sulla sicurezza di alimenti e mangimi.

<http://www.binas.unido.org/binas/>

sito del “Biosafety Information and Network Advisory Service of the United Nations Industrial Development Organisation (UNIDO)”.

<http://www.fao.org/>

fornisce informazioni inerenti all'attività della "Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

<http://www.icgeb.org/~bsafesrv/index.htm>

promuove un utilizzo sicuro delle biotecnologie con particolare riferimento alle necessità dei paesi in via di sviluppo. Nel sito è disponibile una libreria di documenti selezionati sulla biosicurezza.

<http://www.who.int/en/>

sito del "the World Health Organization", l'agenzia delle Nazioni Unite che si occupa di salute, fondata nel 1948.

Altri siti...

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

<http://www.absa.org/>

<http://www.acts.or.ke/index.htm>

<http://www.africabio.com>

<http://www.agbioforum.org/>

<http://www.agbiotechnet.com/>

<http://www.aphis.usda.gov/brs/>

<http://asiabionet.org>

<http://www.bats.ch/index.php?file5=bats/navigation/biosecurity.php>

<http://www.bch.biodiv.org/>

<http://www.bdt.org.br/bioline/by>

<http://www.biodiversityasia.org/>

<http://www.biodiv.org/biosafety/>

<http://biosafety.ihe.be/>

<http://www.biosafety-CEE.org/>

<http://www.biosafetynews.com>

<http://www.blackwellpublishing.com/journal.asp?ref=0272-4332&site=1#top>

http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp

<http://www.efbpublic.org/>

http://europa.eu.int/comm/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
<http://www.ejbiotechnology.info/>
<http://www.elaw.org>
<http://www.essentialbiosafety.info/main.php>
<http://www.foodsafetynetwork.ca/>
<http://www.ifpri.org/>
<http://www.iiia.msu.edu/absp/index.html>
<http://www.oecd.org/biotrack>
<http://www.osservaogm.it>
<http://www.syngentafoundation.com/>
<http://www.twinside.org.sg>
<http://www.uneca.org>
<http://www.unep.ch/> (<http://www.unep.ch/biosafety/resources.htm>)
<http://www.web-dictionary.org/>
<http://www.whybiotech.com>
<http://www.wordiq.com>
<http://www.worldbank.org/>
<http://www.world-food.net/>
<http://www.worldgrowth.org/>

ALCUNE NOTE SUGLI AUTORI

Eugenio Benvenuto

Laurea in Scienze Biologiche all'Università di Roma. Ricercatore nello staff permanente dell'Unità ENEA-BIOTEC presso il Centro Ricerche Casaccia, Responsabile della Sezione Genetica e Genomica Vegetale.

È in possesso di una esperienza ventennale nel campo della genetica molecolare con particolare riferimento alle piante. Esperto nella trasformazione genetica delle piante, in virologia vegetale, in ingegneria proteica di anticorpi e nell'espressione di molecole di interesse biofarmaceutico in piante.

Responsabile delle Unità di ricerca ENEA in vari progetti finanziati da CE nell'ambito di vari Programmi Quadro, dal MIUR e da altre istituzioni nazionali.

ENEA-BIOTEC-GEN, Centro Ricerche Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 S. Maria di Galeria, Roma.

eugenio.benvenuto@casaccia.enea.it

Erica Candioli

Laurea in Scienze Biologiche (Università di Padova), tesi e tirocinio post-lauream presso il laboratorio Biotecnologie IASMA, si è occupata di OGM nell'ambito di una collaborazione triennale nel progetto di ricerca *OSSERVA3* presso l'Agenzia per la Garanzia della Qualità in Agricoltura (AQA), dove ha acquisito competenze anche nel settore della normazione e certificazione volontaria. È componente effettiva dei gruppi di lavoro nazionale UNI GL4 e internazionale ISO/TC 34/WG 7 e sostituta del gruppo di lavoro europeo CEN/TC 275/WG 11 per la normazione di metodi analitici per la ricerca/campionamento di OGM negli alimenti. Svolge intensa attività di consulenza e formazione in materia di sicurezza alimentare, anche a livello universitario. Dal 2003 è Vicepresidente della società BioAnalisi Trentina Srl, laboratorio di analisi di biologia molecolare e consulenza nel settore agroalimentare, di cui è socia fondatrice.

BioAnalisi Trentina Srl, via G. a Prato, 38068 Rovereto

erica@bioanalisitrentina.it

Lorenza Dalla Costa

Laurea in Biotecnologie (Dipartimento di Biologia Animale, Università di Torino), dottoranda in "Scienze agrarie, forestali ed agroalimentari" (Dipartimento Colture Arboree, Università di Torino), ha maturato una significativa esperienza nel campo della rintracciabilità degli OGM nel corso di un tirocinio semestrale presso l'ARPA Piemonte e di una collaborazione triennale presso IASMA (Progetto PAT *OSSERVA3*).

Ha inoltre acquisito una valida competenza nella coltura *in vitro* e nel trasferimento di geni in vite mediante strategie eco-sostenibili nell'ambito di una collaborazione a progetto in corso presso IASMA (Progetto PAT *EcoGenEtic.Com*).

IASMA, Centro Sperimentale, Dipartimento Biologia e Genetica Molecolare, Unità Biologia Cellulare e Molecolare, 38010 San Michele all'Adige (TN)

lorenza.dallacosta@iasma.it

Floriana Marin

Laurea in Economia Politica (indirizzo "Economia e Gestione dell'Ambiente, Risorse Naturali e Sviluppo Sostenibile", Università degli Studi di Trento), Master in Diritto dell'Ambiente Nazionale e Comunitario (AICCRE, sez. Italiana), dottoranda di Ricerca in Economia dell'Ambiente e della Montagna (Facoltà di Economia, Università di Trento), ha acquisito presso IASMA (progetto PAT *OSSERVA3*) competenza dei molteplici aspetti relativi agli OGM, tra cui la gestione dell'informazione, l'accettabilità sociale, la percezione pubblica, la gestione del rischio, la comunicazione scientifica e la divulgazione dell'innovazione. Studia l'applicazione di metodiche proprie della valutazione economica di beni ambientali all'analisi delle attitudini all'acquisto e consumo di alimenti geneticamente modificati ed è collaboratrice a progetto ad IASMA (Progetto PAT *EcoGenEtic.Com*).

IASMA, Centro Sperimentale, Dipartimento Biologia e Genetica Molecolare, Unità Biologia Cellulare e Molecolare, 38010 San Michele all'Adige (TN)

flomarin@itc.it

Lucia Martinelli

Dal 1988 è ricercatrice presso IASMA, dove coordina l'Unità Biologia Cellulare e Molecolare. Laurea in Scienze Biologiche (Istituto di Genetica, Università di Bologna), PhD in *Agricultural and Environmental Sciences* (Istituto di Genetica, Università di Agraria di Wageningen, NL), Master in Giornalismo e Comunicazione Scientifica (Università di Ferrara), dal 1980 conduce ricerca nel campo della genetica molecolare vegetale. La sua maggiore competenza riguarda le problematiche relative al trasferimento di geni esogeni nelle piante, dalla produzione alla rintracciabilità, considerando e gli aspetti laboratoriali e gli aspetti "culturali", *in primis* la valutazione del rischio, della sicurezza e la gestione della comunicazione tra Scienza e Società. Per il lavoro in cui ha dimostrato la possibilità di trasferire e studiare geni esogeni con buone efficienze nel genere *Vitis* ha vinto il primo premio 1994 della Fondazione «Rudolf Hermanns» di Geisenheim (Germania).

IASMA, Centro Sperimentale, Dipartimento Biologia e Genetica Molecolare, Unità Biologia Cellulare e Molecolare, 38010 San Michele all'Adige (TN).

lucia.martinelli@iasma.it

Chiara Nobili

Laurea in Chimica Ambientale (Dipartimento di Chimica, Università “La Sapienza” di Roma), dottoranda in Scienze Botaniche (Università “La Sapienza” di Roma), ha svolto attività di ricerca presso laboratori di chimica ambientale di vari enti ed istituti di ricerca. Dal 2001, si occupa di diagnostica alimentare, in qualità di assegnista di ricerca presso ENEA, dove lavora alla definizione e messa a punto di metodi statistici di campionamento e di tecniche avanzate di estrazione, purificazione e determinazione di sequenze transgeniche in matrici agroalimentari. È in possesso di una considerevole esperienza, nelle tecniche per l’analisi di rintracciabilità, utilizzando metodi analitici altamente risolutivi, come la Real-time PCR. Ha partecipato a progetti di ricerca europei, di tipo EUREKA, finanziato per la parte italiana dal MIUR, dal titolo: *“Metodi di campionamento e di analisi per la determinazione di frammenti di DNA transgenico in alimenti per l’infanzia”*.

ENEA-CR Casaccia, UTS Biotecnologie, Protezione della Salute e degli Ecosistemi, Sezione Genetica e Genomica Vegetale, via Anguillarese 301, 00123 S. Maria di Galeria, Roma.

chiara.nobili@casaccia.enea.it

Edito dall'ENEA

Unità Comunicazione

Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma

www.enea.it

Edizione del volume a cura di Giuliano Ghisu

Copertina: Cristina Lanari

Stampa: Primaprint (Viterbo)

Finito di stampare nel mese di febbraio 2007