

# **Valutazione quali/quantitativa di DNA transgenico nel latte prodotto da aziende a differenti tipologie di stabulazione (Fascicolo P9A)**

*Istituto Superiore di Sanità – DSPVSA – Reparto OGM e Xenobiotici di origine fungina  
Società Produttori Sementi S.p.A*

## **Introduzione**

Le nuove tecniche di ingegneria genetica hanno consentito di sviluppare organismi vegetali ed animali contenenti geni estranei alla loro specie, gli organismi geneticamente modificati (OGM).

La legislazione nazionale e comunitaria definisce un organismo vivente geneticamente modificato (GM) come “un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico e' stato modificato in modo diverso da quanto si verifica in natura mediante accoppiamento o incrocio o con la ricombinazione genetica naturale” (direttiva 2001/18/CE concernente l'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati recepita con il DL 8 luglio 2003, n.224 ).

L'impiego degli OGM nella produzione di alimenti e mangimi è un argomento largamente dibattuto in molti Paesi. Nell'Unione Europea tale dibattito è particolarmente acceso ed i risultati dell'Eurobarometer degli ultimi anni hanno evidenziato la scarsa propensione del consumatore europeo per questa tipologia di alimenti. Come conseguenza di questo orientamento e nell'intento di proteggere la salute del consumatore, la legislazione comunitaria ha emanato una serie di Regolamenti relativi all'impiego degli OGM nella filiera agroalimentare e zootecnica che forniscono obblighi precisi in numerosi campi tra cui quelli dell'etichettatura, della tracciabilità, della coesistenza, delle sperimentazioni e delle coltivazioni in campo. Pertanto, tutti gli alimenti e mangimi che contengono o sono prodotti da OGM devono essere etichettati come tali in modo da permettere al consumatore e agli utilizzatori dei mangimi di esercitare la propria libertà di scelta.

La normativa europea con il Regolamento 1829/2004 riconosce tuttavia che la presenza di materiale GM in prodotti immessi sul mercato possa verificarsi in modo accidentale a causa di cross-contamination nelle fasi di lavorazione, immagazzinamento e trasporto delle derrate. Pertanto la normativa prescrive una soglia (0.9% calcolato sull'ingrediente) al di sotto della quale non è prescritta l'etichettatura, fatta salva la clausola di accidentalità e di inevitabilità.

L'85% della produzione mondiale di soia deriva da Paesi che coltivano soia GM, ed il 96% delle esportazioni mondiali di fave di soia ed il 76% di quelle di farine deriva da Paesi dove viene coltivata soia GM. Attualmente risulta alquanto difficile per il settore mangimistico riuscire a realizzare una alimentazione non OGM, soprattutto per la difficoltà di approvvigionarsi di soia non GM. In termini di prezzo gli studiosi stimano che la soia non-GM e derivati potrà arrivare a costare fino al 25% in più della soia geneticamente modificata. Per i produttori di carne, latte e latticini una differenza così marcata nel prezzo di un ingrediente base per l'alimentazione animale come la soia potrebbe rivelarsi insostenibile.

Nonostante le difficoltà, a livello nazionale per motivazioni di varia natura, la produzione mangimistica si è diversificata in un settore che, previa etichettatura, commercializza mangimi contenenti ingredienti GM e un settore che esclude tali ingredienti, nel rispetto di disciplinari ad hoc quali quelli del settore biologico.

La produzione mangimistica che esclude gli ingredienti OGM, oltre alla difficoltà di reperire materie prime, con particolare riferimento alla soia non GM, deve inoltre confrontarsi con numerosi problemi tecnici e

produttivi: la difficoltà di impiegare linee dedicate, con i problemi collegati di cross-contamination durante l'intero ciclo produttivo, le difficoltà di campionamento, gli elevati costi delle analisi.

Secondo la normativa comunitaria non è richiesta l'etichettatura per i prodotti come carni, latte e uova ottenuti con animali nutriti con mangimi GM o trattati con medicinali prodotti con tecniche di ingegneria genetica. Il razionale per questo provvedimento è che numerosissimi studi effettuati per valutare il destino digestivo del DNA transgenico negli animali alimentati con mangimi OGM, non hanno mai evidenziato la presenza di DNA transgenico (contaminazione endogena) nei prodotti di origine animale quali latte, carni e uova. Tuttavia uno studio recente condotto da ricercatori italiani ha evidenziato la presenza di DNA transgenico nel latte di bovine alimentate con mangimi OGM (RIFERIMENTO). Questi risultati hanno sollevato nuovi interrogativi sulla possibilità di contaminazione endogena da DNA transgenico in prodotti ottenuti da animali alimentati con mangimi contenenti materiale transgenico. L'ipotesi alternativa sull'eventuale ritrovamento di materiale GM nel latte è quella secondo cui, a causa delle diverse tipologie di allevamenti delle bovine, potrebbero verificarsi dei fenomeni di contaminazione ambientale potenzialmente responsabili del trasferimento nel latte stesso di materiale GM contenuto nelle polveri aerodisperse negli ambienti di stabulazione e/o mungitura, qualora nell'allevamento venga utilizzato o mangime GM o mangime non GM ma contenente accidentalmente tracce di materiale GM. Questo tipo di cross-contamination potrebbe essere alla base del riportato ritrovamento di DNA transgenico nel latte.

L'obiettivo di ricerca del presente progetto è stato quello di verificare la natura endogena o esogena della eventuale presenza di DNA transgenico nel latte di massa, prendendo in considerazione la transgenicità attraverso l'amplificazione del promotore 35S presente nel materiale GM.

Il criterio con il quale lo studio è stato effettuato si è basato sulla raccolta di prodotti provenienti da due mangimifici: un mangimificio produttore unicamente di mangimi non GM; un mangimificio produttore sia di mangimi non GM che di mangimi GM.

Sui campioni di mangimi, materie prime, lettieri e latte prelevati secondo le modalità di campionamento definite dalla legislazione, sono state effettuate analisi qualitative e quantitative mediante tecniche di PCR e PCR Real Time che hanno consentito di rilevare la presenza di DNA geneticamente modificato e di calcolare la concentrazione percentuale sulle differenti matrici GM.

# MATERIALI E METODI

## AZIENDE E CAMPIONAMENTO

Ben nota è l'importanza delle modalità di campionamento e della quantità di campione da analizzare e l'influenza che queste possono avere sul risultato finale dell'analisi.

L'errore attribuibile alla fase di campionamento apporta, all'errore totale, un contributo di gran lunga superiore a quello riferibile agli stadi del ciclo analitico. Per il latte, tale assunzione decade in quanto lo stato liquido della matrice garantisce l'omogeneità di distribuzione dell'analita che manca nelle matrici solide come il mangime.

Sono stati effettuati campionamenti sul latte e campionamenti sul mangime costituente il pasto delle vacche stabulate. Sono stati analizzati campioni di latte crudo vaccino e rispettivi mangimi provenienti da aziende a differenti tipologie di stabulazione. Per quanto riguarda il latte sono stati fatti 2 diversi prelievi:

1. sul latte di massa, ossia il prodotto totale delle mucche che confluisce in un unico recipiente;
2. sul latte prelevato dalle singole mucche tramite un macchinario specifico che preleva il latte dalla singola mammella previa sanitizzazione della stessa.

Per quanto riguarda i mangimi, è stata seguita la procedura di campionamento statico seguendo quanto indicato nella Raccomandazione (CE) 787/2004. Tale procedura prevede il campionamento di un numero di campioni elementari in funzione della grandezza del lotto di partenza.

Tutte le aziende possedevano lotti di dimensioni inferiori a 50 tonnellate, conseguentemente sono stati sempre prelevati 10 campioni elementari da 1 kg. Una volta in laboratorio, ciascun campione elementare è stato macinato, omogeneizzato e suddiviso in due frazioni di 0,5 kg: una frazione è stata destinata alla formazione del campione elementare per la produzione del campione globale (frazioni riunite, campione globale di 5 kg), l'altra frazione è stata conservata come campione elementare per la conservazione (sacchetti individuali da 0,5 kg ciascuno). L'insieme dei campioni elementari per la conservazione (10 per ogni campionamento eseguito) sono stati conservati in attesa degli esiti delle analisi del campione globale poiché nel caso questo avesse dato un valore vicino alla soglia  $\pm 50\%$  del suo valore, si sarebbero analizzati i 10 campioni elementari per la conservazione per la stima dell'incertezza. Le tipologie di mangime, descritte più avanti nel testo, sono state a base di soia, a base di mais e mangimi proteici arricchiti (nucleo), GM o non GM a seconda di quanto indicato in etichetta.

### AZIENDE

Sono state campionate 6 aziende con diverse modalità di stabulazione (libera, semi fissa e fissa), diverse organizzazioni della mungitura (vicino o lontano alla fonte di alimenti). Si riporta qui di seguito la lista delle aziende oggetto di campionamento:

**AZIENDA I** – Azienda a stabulazione fissa con rifornimento di mangime convenzionale sala mungitura vicino alla mangiatoia;

**AZIENDA II** – Azienda a stabulazione semi fissa con rifornimento di mangime biologico sala mungitura vicino alla mangiatoia;

**AZIENDA III** – Azienda a stabulazione fissa con rifornimento di mangime non OGM sala mungitura vicino alla mangiatoia;

**AZIENDA IV** – Azienda a stabulazione libera con rifornimento di mangime non OGM sala mungitura lontano dalla mangiatoia;

**AZIENDA V** – Azienda a stabulazione libera con rifornimento di mangime non OGM e sala mungitura vicina alla preparazione degli alimenti

**AZIENDA VI** – Azienda a stabulazione libera con rifornimento di mangime convenzionale e sala mungitura vicino alla sala preparazione alimenti.

#### PRELIEVI

##### • **1° prelievo: MANGIME E LATTE**

E' stato effettuato in data 12-11-07. I campioni prelevati, arrivati il 14-11-07, sono stati i seguenti:

1 bottiglia, 0.5L: latte di massa biologico;

1 bottiglia, 0.5L: latte di massa convenzionale;

10 bottiglie, 0.1L ciascuna: latte proveniente dalle singole mucche biologiche, contrassegnate da numero progressivo;

10 bottiglie, 0.1L ciascuna: latte proveniente dalle singole mucche convenzionali, contrassegnate da numero progressivo.

Il numero dei campioni di latte totali è stato di 22.

Le aziende (I e II) erano a stabulazione fissa e semi fissa. Il mangime corrispondente era convenzionale "15-35" (contenente: 15% di soia GM e 35% di mais) e biologico non OGM.

##### • **2° prelievo: MANGIME E LATTE**

E' stato effettuato in data 3-3-2008 e il latte corrispondente è stato prelevato il 10-3-2008. La stalla, a stabulazione fissa con mangime convenzionale, la stessa stalla del 1° prelievo, il mangime è il "15-35". I campioni sono arrivati il 13-3-2008 nella quantità di:

1 bottiglia, 0.5L, latte di massa convenzionale,

10 bottiglie, 0.1L ciascuna, latte convenzionale proveniente dalle singole mucche

per un totale di 11 campioni di latte.

##### • **3° prelievo MANGIME E LATTE**

E' stato effettuato il 4-7-2008; sono stati effettuati due campionamenti di mangime: il mangime "soia" (denominato "Dairy Over Top" contenente il 30% di soia e 40 % mais); il mangime "mais" (denominato "Starch Gold", contenente: 95% di mais).

La stalla era a stabulazione fissa, con autoalimentatori e mangime non OGM (Azienda III)?????. I campioni di latte totali sono 11:

11 bottiglie, 0.5L, latte di massa,

10 bottiglie, 0.1L ciascuna, provenienti dalle singole mucche.

• **4° prelievo MANGIME E LATTE**

E' stato effettuato in data 29-9-2008 presso una stalla a stabulazione libera, non OGM, con sala di mungitura lontana dalla preparazione degli alimenti (Azienda IV)??

I campioni di latte pervenuti il 1-10-2008 sono stati:

2 bottiglie (perché abitualmente il latte di mungitura è stoccato in due contenitori), 0.5L: latte di massa;

10 bottiglie, 0,1L ciascuna: latte proveniente dalle singole mucche biologiche contrassegnate da numero progressivo.

I campioni relativi al mangime sono stati:

Mangime "Nucleo PAM" (farina di soia di estrazione, soia integrale e farina di girasole);

Mangime mais (interamente di granella di mais).

• **5° prelievo: MANGIME E LATTE - azienda a stabulazione fissa, mangime non OGM**

Ha riguardato un'azienda a stabulazione libera, non OGM con preparazione degli alimenti vicino alla sala di mungitura. (AZIENDA V)

Sono pervenuti in laboratorio in data 11-3-2009:

10 bottiglie da circa 100ml di latte proveniente dalle singole mucche biologiche,

1 campione da ½ litro di latte di massa.

I mangimi sono di due tipi:

Mangime "Nucleo PAM" (farina di soia di estrazione, soia integrale e farina di girasole; 10 campioni);

Mangime (interamente composto di granella di mais; 10 campioni)

• **6° ed ultimo prelievo: MANGIME E LATTE**

Il campionamento è stato effettuato presso una stalla a stabulazione libera con alimentazione convenzionale e preparazione degli alimenti vicino alla sala di mungitura. (AZIENDA VI). I campioni di latte pervenuti in data 30-06-2009, sono stati 10, prelevati dalle singole mucche (0.1L), più un campione di latte di massa (0.5L).

I mangimi campionati sono di 3 tipi:

Mangime costituito da mais

Mangime costituito da soia

Mangime costituito da nucleo proteico a base di soia integrale, farina di estrazione di soia e girasole.

## **METODI DI ANALISI**

### ESTRAZIONE DEL DNA

#### **PRINCIPIO DELL'ESTRAZIONE**

L'estrazione del DNA costituisce uno dei punti critici per l'intera analisi degli OGM: al fine di ottenere DNA di buona qualità (intatto, costituito da frammenti di grosse dimensioni) è necessario individuare il metodo di estrazione più idoneo per la matrice alimentare in analisi.

La fase di estrazione può essere relativamente semplice nel caso di prodotti grezzi o di semilavorati (sementi, farine); queste matrici non avendo subito procedimenti di lavorazione drastici permettono l'ottenimento di DNA integro e di facile estrazione.

#### **ESTRAZIONE DEL DNA DA LATTE**

Nel caso di alimenti lavorati o matrici complesse come il latte, l'estrazione risulta alquanto complessa per la presenza di varie sostanze come le proteine, i grassi e i carboidrati, che possono inibire il processo estrattivo diminuendo la resa del DNA estratto.

Considerando la tipologia di campioni a disposizione, è stato necessario non solo applicare protocolli di estrazione diversi, ma è stato anche necessario ottimizzare gli stessi apportando modifiche specifiche al fine di rendere quanto più efficiente la resa della fase di estrazione. Prima di procedere all'estrazione del DNA dai campioni in esame, tenendo presente le difficoltà relative a tale matrice, è stata effettuata la messa a punto del metodo estrattivo, previa documentazione dalla letteratura presente. La prima estrazione, applicando il metodo del CTAB Classico (descritto più avanti nel testo) (Swiss Food Manual, L 23.01.22-1, 1998), è stata condotta sul pellet, ottenuto mediante centrifugazione a 10000 rpm di latte crudo vaccino (latte di prova). Dati i bassi valori di concentrazione del DNA rilevati sono state avviate successive sperimentazioni. La seconda prova di estrazione è stata effettuata applicando il protocollo modificato del CTAB (Roland Ernest Poms, et al. 2001) che prevede una incubazione over night a 56°C in bagno termostato, dopo l'aggiunta del buffer di estrazione. Questa estrazione è stata condotta su tutte e tre i prodotti della centrifugazione del latte (10000 rpm): la crema, il siero e il pellet. I risultati ottenuti in seguito alla lettura degli estratti al Nanodrop (spettrofotometro di ultima generazione), hanno rivelato una concentrazione ed una qualità del DNA accettabile per il pellet, scarsa per il siero e, infine, nulla per la crema. Inoltre, poiché talvolta con i metodi citati non si aveva materiale sufficiente e/o di qualità adeguata, sono stati applicati altri metodi estrattivi seguendo protocolli specifici da kit commerciali: Kit Nucleospin Plant I (Machery-Nagel), e Genelute Plant Genomic DNA Miniperp Kit (Sigma).

#### **ESTRAZIONE DEL DNA DA MANGIME**

Il protocollo classico usato per l'estrazione del DNA dai tessuti vegetali è dato dal metodo "CTAB" (Swiss Food Manual, L 23.01.22-1, 1998). I campioni di alimenti vengono incubati in presenza di un detergente CTAB (esadeciltrimetil-ammonio bromuro), il DNA rilasciato viene purificato in presenza di cloroformio (denaturante delle proteine) e precipitato con isopropanolo. Dal momento che il DNA estratto dal mangime tramite questo metodo è risultato ottimo per resa e qualità, non è stato necessario applicare altri metodi estrattivi. Tutti i campioni di mangime pervenuti dalle varie aziende, sono stati estratti con tale metodo.

#### **METODI DI ESTRAZIONE**

## **METODO DEL CTAB CLASSICO**

### **Estrazione**

- Pesare 1g di campione d'analisi precedentemente macinato in una falcon da 50 ml, aggiungere 7.5mL di CTAB preriscaldato a 65°C buffer di estrazione e mescolare con un vortex.
- Aggiungere 15µL di una soluzione di RNasi A ad una concentrazione di 10mg/ml e mescolare gentilmente.
- Incubare per 30 minuti a 65°C sotto agitazione costante in un bagno termostato.
- Aggiungere 200µL di una soluzione di Proteinasi K ad una concentrazione di 20mg/mL, e mescolare.
- Incubare per 30 minuti a 65°C in agitazione in un bagno termostato.
- Centrifugare 15 minuti a 10000 rpm.
- Trasferire 900µL di supernatante in una provetta da 2mL ed aggiungere un volume di cloroformio, e mescolare per 30 secondi.
- Centrifugare per 15 minuti a 12000 rpm.
- Trasferire la fase acquosa in una nuova provetta.

### **Precipitazione con CTAB**

- Aggiungere 2 volumi di buffer CTAB precipitante ed incubare per 60 minuti in frigo senza agitazione.
- Centrifugare 15 minuti a 12000 rpm.
- Scartare il supernatante (in questo passaggio il pellet può anche non essere visibile).
- Dissolvere il DNA precipitato aggiungendo 350µL di NaCl in soluzione 1,2M e pipettare.
- Aggiungere 350 µL di Cloroformio e mescolare.
- Centrifugare 10 minuti a 12000 rpm.
- Trasferire la fase acquosa in una nuova provetta.

### **Precipitazione del DNA**

- Aggiungere 0,6 volumi di isopropanolo, mescolare per inversione la provetta.
- Porre la provetta 20 minuti a temperatura ambiente.
- Centrifugare 15 minuti a 12000 rpm.
- Scartare il supernatante.
- Aggiungere 500µL di una soluzione di etanolo al 70% e mescolare, (questo passaggio è fondamentale per rimuovere completamente il CTAB residuo).
- Centrifugare 10 minuti a 12000rpm.
- Scartare il supernatante.
- Seccare il pellet di DNA e ridissolverlo in 100µL di acqua sterile.
- Questo è lo stock del nostro DNA.
- E' consigliato incubare il campione una notte a 4°C per permettere la sua completa risospensione.

I protocolli di estrazione prevedono l'aggiunta di detergenti quale il CTAB (50 mM hexadecyl-trimethyl ammoniumbromide, 1.4M NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA) preriscaldato a 65°C (per rendere la soluzione omogenea) necessario a solubilizzare i lipidi della membrana plasmatica della cellula da cui si ottiene così una miscela contenente le componenti intracellulari che sono state rilasciate (DNA, RNA, proteine e carboidrati). L'EDTA presente nella soluzione di CTAB elimina i cationi bivalenti e inibisce la

DNAsi che altrimenti degraderebbe il DNA. La successiva incubazione a 65°C, sotto agitazione della miscela di estrazione con RNAsi e Proteinasi K (con tempi diversi di incubazione), comporta l'eliminazione dalla miscela di proteine e RNA che arrecherebbero problemi di inibizione durante la fase di PCR alla Taq polimerasi.

### **CTAB MODIFICATO**

Dopo aver centrifugato il latte tal quale in modo tale da separare le 3 frazioni costituenti: crema, siero, pellet; l'estrazione è stata effettuata su tutte applicando una modifica al protocollo classico, ovvero dopo l'aggiunta di CTAB Buffer di estrazione, i campioni sono stati posti in agitazione nel bagno termostato a 56°C per un'intera notte. Il giorno seguente si è proceduto secondo il protocollo del CTAB classico (Roland Ernest Poms et al 2001).

### **KIT NUCLEOSPIN PLANT II (Ready- to- use system for fast purification of nucleic acids - MACHEREY-NAGEL)**

Questo kit è stato per l'estrazione del DNA dai campioni di latte, esso include due differenti buffers di lisi: buffer di lisi PL1 basato sulla procedura del CTAB( detergente carico positivamente), buffer di lisi PL2 che usa l'SDS come detergente (carico negativamente). L'estrazione è stata eseguita secondo il protocollo fornito dal produttore, partendo sia da latte tal quale che da siero.

### **GENELUTE PLANT GENOMIC DNA MINIPERP KIT SIGMA**

L'estrazione è stata effettuata secondo il protocollo fornito dal produttore.

### ANALISI PCR

La disponibilità di metodi di analisi che consentono di verificare e quantificare la presenza di OGM negli alimenti è indispensabile per rendere più trasparente l'utilizzo di prodotti alimentari ottenuti con piante OGM in considerazione della normativa vigente che introduce norme sull'etichettatura nell'ottica del "right to know" del consumatore.

Le tecniche analitiche per rilevare la presenza di OGM sono principalmente due: tecniche di analisi delle proteine (tecniche immunologiche), che permettono di rilevare la presenza di proteine derivanti dalla modificazione genetica; tecniche di analisi del DNA (tecniche PCR) che consentono di rilevare la presenza di DNA GM.

Il metodo di elezione per la ricerca di OGM e loro derivati negli alimenti si basa sulla rilevazione della presenza del DNA ricombinante mediante la reazione di PCR (Windels et al 2003; Saiki et al 1985, 1988); questa tecnica presenta una elevata sensibilità e versatilità.

I metodi analitici di tipo qualitativo rappresentano uno strumento indispensabile soprattutto come metodi di screening e di caratterizzazione delle differenti piante GM prima dell'analisi quantitativa. Vengono di seguito descritti i principi dell'analisi del DNA qualitativa, che permette di rilevare la presenza o l'assenza della modificazione genetica e quelli concernenti l'analisi del DNA quantitativa, che permette la determinazione quantitativa del contenuto di OGM negli alimenti.

### **ANALISI QUALITATIVA**



Le tecniche analitiche necessarie per rilevare la presenza-assenza di OGM o di un suo derivato negli alimenti si basano sulla rivelazione della macromolecola (DNA, RNA o proteina) che è specificamente associata o deriva dalla modificazione genetica.

Le tecniche di analisi del DNA o RNA si basano sulla reazione a catena della polimerasi, PCR (Polimerase Chain Reaction) che permette di rilevare la presenza di DNA o RNA transgenico.

Al termine della reazione di PCR per la rilevazione della presenza di DNA geneticamente modificato, un'aliquota del prodotto di amplificazione viene analizzata mediante gel elettroforesi.

### **PCR QUALITATIVA PER VERIFICA AMPLIFICABILITA' E INIBIZIONE**

Per verificare l'amplificabilità del DNA di latte estratto da latte crudo di prova è stata messa a punto una PCR qualitativa per il gene della caseina, proteina abbondantemente presente nel latte, usando il seguente protocollo:

- DNA 10µl
- Buffer 2,5µl
- MgCl<sub>2</sub> 1,5µl(25mmol/l)
- Primers F/R 0,25µl (JK302;JK501)
- Taq polimerasi 0,2 µl (5U/µl).
- dNTP 2µl (25mmol/l) ed H<sub>2</sub>O 8,3µl

Per quanto riguarda le condizioni strumentali di PCR abbiamo seguito le fasi riportate:

- Denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti e
- Amplificazione 35 cicli: di 30" a 95°C; 30" a 55°C; e 1' a 72°C.

Dato l'esito positivo della PCR condotta, il DNA è stato giudicato amplificabile.

E' stata effettuata una seconda PCR qualitativa per verificare se il DNA estratto dal latte inibisse l'amplificazione dell'eventuale DNA di soia (o mais). Tale PCR amplifica il gene della lectina (gene endogeno di soia, con sequenze di primer forward, F, e reverse R, F/GMO3, R/GMO4, rispettivamente). Sperimentalmente, nel caso della soia, sono stati aggiunti 30µl di DNA di soia allo 0,5% a 20µl di DNA di latte, per avere una concentrazione finale di DNA caricato su gel pari a 18,72 ng/µl. Il protocollo di PCR ha seguito il seguente protocollo:

- DNA 5µl
- Buffer 2,5µl
- MgCl<sub>2</sub> 1.5µl (25mmol/l)
- Primers F/R 0.25µl (GMO3;GMO4 20µmol/l)
- dNTP 2µl(25mmol/l) ed H<sub>2</sub>O 13,4µl
- Taq polimerasi 0.2 µl (5U/µl).
  - Attivazione/denaturazione: 10' a 95°C
  - Amplificazione (40 cicli): 50" a 97°C; 1' e 55" a 65°C; 1'e 55" a 72°C

L'amplificazione del DNA ha dimostrato l'assenza di inibizione dei geni della soia/mais nel DNA estratto dal latte .

Per verificare che l'inibizione non si verificasse in fase di estrazione si è preparato un campione di pellet addizionato 0.5g di farina di soia 0,1% (Materiale Certificato di Riferimento). il DNA è stato estratto da questo campione secondo il protocollo del CTAB modificato, ed è stato sottoposto ad analisi PCR seguendo il protocollo sopra descritto.

L'estrazione ha avuto esito positivo in resa e qualità del DNA estratto, e la corrispondente analisi in PCR ha confermato l'assenza di inibizione.

La presenza del gene P35S (gene promotore presente nel caso di soia o mais transgenici) è stata verificata con una PCR qualitativa seguendo il seguente protocollo:

- DNA 5µl
- Buffer 2,5µl
- MgCl<sub>2</sub> 1,5µl(25mmol/l)
- Primers F/R 0,25µl(CF3;CR420µmol/l)
- dNTP 2µl(25mmol/l)
- Taq polimerasi 0,2 µl (5U/µl)
- H<sub>2</sub>O 12,32µl.
  - Attivazione/denaturazione: 10' a 95°C
  - Amplificazione (40 cicli): 25" a 95°C; 30" a 62°C; 45" a 72°C; 7' a 72°C.

Per il mangime non è stato necessario procedere a nessun tipo di ottimizzazione date le ottime rese in termini di qualità e amplificabilità degli estratti.

## **ANALISI QUANTITATIVA DI LATTE E MANGIME**

L'entrata in vigore del recente Regolamento 49/2000 ha reso necessario lo sviluppo di metodi di analisi quantitativa, in grado di determinare il contenuto percentuale di OGM in materie prime e prodotti finiti. L'approvazione del regolamento 1829/2003 ha modificato la soglia abbassandola dal 1% allo 0,9% riferito ad ogni singolo ingrediente.

La metodica più accreditata a livello nazionale ed internazionale attualmente a disposizione per materie prime e prodotti finiti è la REAL TIME PCR (Windels P. et al. 2003; Holck A .et al , 2002; Anklam et al , 2002), la quale si basa sull'analisi del DNA utilizzando tecniche di PCR.

Tutti i DNA estratti dai campioni di latte e mangime corrispondente sono stati analizzati in REAL TIME PCR, per determinarne il contenuto in percentuale di OGM, il metodo usato è il costrutto specifico che utilizza plasmidi come calibranti, vengono costruite due curve di calibrazione una per il transgene ed una per il gene endogeno utilizzando materiali a contenuto noto di soia GM, la percentuale di DNA transgenico viene calcolata in base al rapporto tra due quantità (numero di copie genomiche del transgene/numero di copie genomiche del gene endogeno). Utilizzando il programma Excel è possibile costruire le due curve di calibrazione, una curva per il gene endogeno e una curva per il transgene, necessarie per l'elaborazione dei dati indicando sull'asse delle ascisse il logaritmo del numero di copie genomiche e sull'asse delle ordinate i valori di Ct. In questo modo impostando la formula matematica  $Y=mx + q$  è possibile ricavare il numero di

copie genomiche relative ai campioni incogniti analizzati partendo dai Ct ricavati durante l'analisi di PCR (Scindo et al 2002; Kuribara et al 2002).

In questo studio, la quantificazione della percentuale di soia RR contenuta nei campioni analizzati è stata eseguita mediante saggio Taqman con una PCR real time di tipo "simplex" (per la trattazione dei principi di tale analisi si rimanda al capitolo 5), in cui l'amplificazione della sequenza del gene lectina e del transgene presenti nella soia Roundup Ready avvengono in pozzetti di reazione separati (ISO 21570:2005- annex: C.4 Construct-specific method for the quantitation of soya bean line GTS 40-3-2 based on real time PCR).

L'analisi quantitativa è stata eseguita con il 7700 ABI PRISM Sequence Detection System.

Secondo il metodo di analisi già validato (ISO-21570:2005) sono stati utilizzati primers e sonde disegnate e validate per la loro specificità e selettività; gli oligonucleotidi sono stati sintetizzati e forniti dalla Applied Biosystem, le cui sequenze sono di seguito riportate.

- Sonda TaqMan per il gene Lectina (FAM):
  - 5'-AGC TTC GCC GCT TCC TCC AAC TTC AC-TAMRA 3'
- Coppia di Primer per la Lectina (forward e reverse)
  - F-5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TT-3'
  - R-5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC A -3'
- Sonda TaqMan per il transgene della soia Roundup Ready (FAM)
  - 5'-CGC AAC CGC CCG CAA ATC C- TAMRA 3'
- Coppia di primer per la soia Roundup Ready (forward e reverse)
  - F-5'-CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TGG-3'
  - R-5'-GAC TTG TCG CCG GGA ATG -3'

La miscela di amplificazione contiene la TaqMan Universal Mastermix, primers, sonde ed il DNA estratto, in un volume finale di 25 µl (tabella A e tabella B)

**Tabella A: reagenti per la MasterMix Lec (simplex)**

Reagenti	LECTINA	
	Concentrazione finale	Volume per triplicato (µl)
Campione/DNA	1-200 ng/µl	15
Acqua		12
Universal Mastermix*		37,5
Sonda Lectina FAM 500 µmol/l	200 nmol	3,0
Primer_Lectina 50 µmol/l	700 nmol	3,75
Volume finale		71,25

\*contiene l'AmpliTaq Gold Polimerasi, (5 U/mL) soluzione di dNTP 200uM per ciascuno, soluzione MgCl<sub>2</sub> 25 mM, soluzione di tampone 10xPCR e l'AmpErase UNG (1 U/mL)

**Tabella B: reagenti per la MasterMix RRS (simplex)**

*Roundup Ready*

Reagenti	Concentrazione finale	Volume per triplicato (µl)
Campione/DNA	1-200 ng / µl	15
Acqua		12
Universal Mastermix*		37.5
Sonda RR FAM 500 µmol/l	200 nmol/l	3
Primer_RR 100 µmol/l	750 nmol/l	3.75
Volume finale		71.25

\*contiene l'AmpliTaq Gold Polimerasi, (5 U/mL) soluzione di dNTP 200µM per ciascuno, soluzione MgCl<sub>2</sub> 25 mM, soluzione di tampone 10xPCR e l'AmpErase UNG (1 U/mL)

Il programma di amplificazione è quello universale, consigliato per tutte le applicazioni, dalla Applied Biosystem (Livak et al., 1995) ed è mostrato in tabella C.

**Tabella C Programma di amplificazione**

<b>Attivazione/Denat.</b>	2min /50°C + 10min/95°C
<b>Amplificazione/Estensione</b>	30s /95°C 1min /59°C
<b>Numero di cicli</b>	45

Le PCR Quantitative condotte per i geni del mais sia nel latte che nel mangime, seguono lo stesso schema, le cui sequenze sono di seguito riportate:

- Sonda TaqMan per il gene endogeno del mais SSIIB (FAM):  
5'-AGC-AAA-GTC-AGA-GCG-CTg-CAA-TGC-A-TAMRA3'
- Coppia di Primer per il gene SSIIB (forward e reverse)  
F-5'-CTC-CCA-ATC-CTT-TGA-CAT-CTG-C-3'  
R-5'-TCG-ATT-TCT-CTC-TTG-GTG-ACA-GG-3'
- Sonda TaqMan per l'evento transgenico del mais MON810 (FAM):  
5'-AGA-TAC-CAA-GCG-GCC-ATG-GAC-AAC-AA-TAMRA3'.
- Coppia di primers per del mais MON810 (forward e reverse)  
F-5'-GAT-GCC-TTC-TCC-CTA-GTG-TTG-A-3'  
R-5'-GGA-TGC-ACT-CGT-TGA-TGT\_TTG-3'.

E' stata effettuata anche una PCR quantitativa metodo costruito specifico per il gene 35S, alle stesse condizioni di cui sopra,

- Sonda TaqMan per il gene P35S (FAM):  
5'-CCC-ACT-ATC-CTT-CGC-AAG-ACC-CTT-CCT-TAMRA-3'
- Coppia di Primer per il gene P35S (forward e reverse)  
F-5'-ATT-GAT-GTG-ATA-TCT-CCA-CTG-ACG-T-3'  
R-5'-CCT-CTC-CAA-ATG-AAA-TGA-ACT-TCC-T-3'

## **RISULTATI E CONCLUSIONI**

### **ESTRAZIONE E RESE**

L'analisi dei campioni di latte e mangime provenienti dai campionamenti delle sei aziende, è stata preceduta dalla messa a punto del metodo estrattivo più idoneo all'ottenimento di DNA a concentrazioni e qualità adeguate per l'analisi PCR.

Per quanto riguarda il mangime, matrice composta che tuttavia non presenta difficoltà per la fase di estrazione, il protocollo utilizzato è stato quello del CTAB classico. Le analisi eseguite sulle aliquote di laboratorio prelevate dal campione globale, hanno dato buone rese in termini di concentrazione e di qualità del DNA. In tabella 1 sono mostrati i valori ottenuti dai diversi mangimi analizzati; i valori oscillano in un intervallo che va da 90 a 350 ng/μl, quantità più che sufficienti per l'analisi quantitativa, inoltre l'assenza di inibizione, dimostrata con la PCR qualitativa, ha dimostrato anche la buona qualità del DNA sottoposto ad analisi quantitativa per la presenza di eventi transgenici.

Per quanto riguarda l'analisi del latte, in assenza di protocolli estrattivi di riferimento, dopo aver indagato in letteratura, si è resa necessaria una fase di messa a punto del metodo realizzata su latte crudo vaccino di prova. Il protocollo che ha dato migliori risultati è stato quello del CTAB modificato (vedi Materiali e Metodi) in cui è stato aggiunto uno step di incubazione over-night a 56°C (Roland Ernest Poms, Josef Gloszl, Helmut Foissy (2001) "Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat" Eur Food Res Technol (2001) 213:361-365). Tuttavia, dalle tabelle riportate (tabelle 3-9) si vede che sono stati applicati in totale cinque protocolli (vedi Materiali e Metodi per descrizioni specifiche) differenti su ciascuna delle fasi del latte analizzate (crema, siero, pellet). Ciò è stato necessario perché le rese, in termini di concentrazione, erano in generale basse e si è cercato di arrivare a valori i più alti possibile, al fine di non avere situazioni di insufficiente numero di copie genomiche per la successiva analisi di PCR. Durante gli esperimenti di estrazione si è verificato che le differenti fasi costituenti il latte, ovvero crema, siero e pellet, non possono essere congelate prima dell'analisi perché si ha una degradazione del DNA nella matrice complessa. Per questo motivo tutte le analisi sono state condotte su latte fresco refrigerato a 4°C, munto da non più di 3 giorni dall'arrivo in laboratorio.

Nelle tabelle 3-9, che registrano le rese di estrazione dal latte per ciascuna campionatura avuta dalle aziende, si riportano i dati ottenuti con tutti i metodi applicati nella fase di estrazione. Come si vede, le rese sono mediamente basse; dai dati ottenuti sono emersi due importanti risultati: *i)* quando sono state analizzate le diverse fasi di latte, il siero ed il pellet sono stati i substrati più idonei all'estrazione; *ii)* fra i diversi metodi messi a punto e testati, il metodo di estrazione con il KIT NUCLEOSPIN PLANT II (Ready-to-use system for fast purification of nucleic acids - MACHEREY-NAGEL) e la metodica del CTAB classico si sono rivelati i più efficaci (tabella 3 per il siero, tabella 4 per il siero e latte tal quale, tabella 5 per il pellet e siero, tabella 6 per il siero, tabella 7 per il siero, tabella 8 per il siero tabella 9 per il pellet). Le altre metodiche provate non hanno mai dato risultati incoraggianti (tabella 3, tabella 4 e tabella 5), pertanto, sono state utilizzate solo nei casi in cui dagli altri due metodi non si ottenevano risultati. La metodica indicata in tabella 8 come metodo 6 (metodo CTAB modificato con aggiunta di una fase di precipitazione con acetato di sodio) è stata provata una sola volta sul siero di massa e dato lo scarso risultato non si è ritenuto opportuno usarlo ulteriormente.

### **ANALISI QUALITATIVA**

Dopo la messa a punto del metodo estrattivo, prima di passare ad analizzare i campioni di latte delle varie aziende in esame, la qualità del DNA estratto è stata valutata per la sua amplificabilità con una analisi di PCR qualitativa per i geni della caseina (JK302, JK501, gene endogeno del latte) proteina abbondantemente presente nel latte. L'esperimento ha dato esito positivo, e l'evento di amplificazione di tale tratto del gene ha confermato che si trattava di DNA di latte. Per il gene endogeno di soia lectina (primers F/R GMO3, GMO4) sono state effettuate due successive PCR qualitative: *i)* per verificare se il DNA del latte in qualche modo inibisse l'amplificazione del DNA di soia (per questo è stato aggiunto al DNA di latte estratto da pellet, DNA di soia 0,5%GM); *ii)* per verificare se l'inibizione del DNA di latte su quello di soia potesse avvenire durante la fase di estrazione (per questo è stato aggiunto al pellet di latte 0,5 g di soia 0,1%GM). In entrambi i casi, il DNA si è amplificato dimostrando l'assenza di inibizione. Per quei materiali (campioni con rese di estrazione *negativo* in tabella 9 e tabella 8) per i quali non è stato possibile avere alcun DNA, non avendo prodotto alcun risultato in fase di estrazione, non è stata data alcuna indicazione di resa. E' da rilevare che le prove di estrazione sono state condotte anche sul latte tal quale (tabella 4) con rese soddisfacenti, tuttavia il latte tal quale non si è potuto analizzare in PCR perché inibitori estratti impedivano l'amplificabilità del DNA.

Per i mangimi queste analisi non sono state necessarie dal momento che il metodo estrattivo produceva ottimi risultati in resa e qualità di DNA estratto. Inoltre, sono stati condotti esperimenti per la determinazione del limite di rilevabilità (LOD), analizzando diluizioni seriali della soia amplificando il gene P35S (con primers F/R: CF3 / CR4), sempre tramite PCR qualitativa. Si è individuato un limite di amplificabilità pari a 0,005%. In tabella 1 sono riportati i valori medi delle rese di estrazione ottenute dalle tipologie di mangimi analizzati.

## **ANALISI QUANTITATIVA**

**Mangimi** Sono stati sottoposti ad analisi di PCR quantitativa metodo costruito specifico i campioni di DNA estratto da mangime pervenuto da tutte le aziende. I mangimi che presentavano in etichetta la dichiarazione di ingrediente GM (geneticamente modificato) hanno confermato in PCR la transgenicità (in tabella 2 sono riportati i valori di % RRS). Tutti i mangimi dichiarati non GM hanno confermato l'assenza di eventi transgenici (in tabella 2 sono riportati i risultati <LOD o i bassi valori di %RRS). Nella tabella 2 si riportano i risultati in termini di % di RRS relativi alle analisi eseguite per ciascuna azienda: per i mangimi delle aziende II, III, IV e V dichiaranti l'uso di mangimi non OGM, è stata confermata tale dichiarazione; le aziende I e VI hanno confermato gli alti valori di RRS dichiarati in etichetta.

**Latte** Le PCR quantitative sono state condotte su quei campioni di DNA estratto selezionati per la maggiore resa ed assenza di inibizione in PCR qualitativa. Sono stati analizzati in RT-PCR tutti i campioni di latte di massa e di latte proveniente dai singoli prelievi delle mucche. I risultati che si leggono in tabella sono le medie fra le singole estrazioni del latte di massa e del latte delle singole mucche. L'unica eccezione si è avuta per quei campioni (tabella 9 e tabella 8) con rese di estrazione nulle; tali campioni non sono stati analizzati in PCR quantitativa e i risultati riportati in tabella 2 mostrano le medie del pool senza i negativi. In tabella la voce n.a. è associata a campioni che sono quelli non analizzati perché in etichetta non erano dichiarati GM.

L'analisi PCR è stata un'analisi costruita specifico per il gene 35S (si veda materiali e metodi per i dettagli).

Tutti i valori delle analisi in PCR quantitativa hanno evidenziato copie genomiche al di sotto della soglia di rilevabilità (<LOQ), ciò significa che la quantità amplificabile per l'evento specifico in questione (soia e mais

transgenici) è risultata sotto le 5 copie genomiche (LOQ) pari a 0,005% di GM; conseguentemente in nessun caso si è avuta positività, in termini di transgenicità, nelle analisi effettuate. Nella tabella 2 sono riportati i valori delle medie per il latte di massa e per il latte da singole mucche (valori mediati sui 10 prelievi delle singole mucche) che sono stati trovati per ogni azienda.

## CONCLUSIONI

I dati mostrano chiaramente che in nessun caso si è avuto passaggio di materiale transgenico esogeno dal mangime al latte corrispondente, escludendo la possibilità di contaminazione ambientale che avrebbe causato il trasferimento nel latte stesso di materiale GM contenuto nelle polveri aerodisperse negli ambienti di stabulazione e/o mungitura, anche nei casi di mangime RRS al 90%.

Analogha considerazione si deve trarre per la eventuale presenza di materiale transgenico endogeno, in quanto nei campioni di latte prelevati direttamente dalle vacche non si è riscontrata alcuna presenza di DNA transgenico quantificabile.

Lo studio pertanto dimostra che anche in presenza di stabulazione effettuata con mangime GM il passaggio nel latte di DNA transgenico non avviene

<b>Tabella 1</b>						
<b>Rese medie di estrazione del mangime con il metodo CTAB</b>						
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>
<b>Aziende a differente dtabulazione</b>	<b>Stab fissa/ mangime convenzionale</b>	<b>Stab semi fissa/ mangime bilogico</b>	<b>Stab fissa/ autoalimentatori/ mangime non OGM</b>	<b>Stab libera/ mangime non OGM/ sala mungitura lontana dalla preparazione degli alimenti</b>	<b>Stab libera/ mangime non OGM / sala mungitura vicina alla preparazione degli alimenti</b>	<b>Stab libera/ mangime convenzionale/ sala mungitura vicina alla preparazione degli alimenti</b>
<b>Mangime di soia</b>	220,0 ng/μl	350,0 ng/μl	310,4 ng/μl	260 ng/μl	180 ng/μl	180 ng/μl
<b>Mangime di mais</b>			130,0 ng/μl	105 ng/μl	90 ng/μl	90 ng/μl
<b>Mangime integrato (NUCLEO PAM)</b>						350 ng/μl



Tabella 2

**AZIENDE A DIFFERENTE STABULAZIONE**

	I	II	III	IV	V	VI
	Stab fissa/ mangime convenzionale	Stab semi fissa/ mangime biologico	Stab fissa/ autoalimentatori/ mangime non OGM	Stab libera/ mangime non OGM/ sala mungitura lontana dalla preparazione degli alimenti	Stab libera/ mangime non OGM / sala mungitura vicina alla preparazione degli alimenti	Stab libera/ mangime convenzionale/ sala mungitura vicina alla preparazione degli alimenti
	% OGM PCR QUANTITATIVA	% OGM PCR QUANTITATIVA	% OGM PCR QUANTITATIVA	% OGM PCR QUANTITATIVA	% OGM PCR QUANTITATIVA	% OGM PCR QUANTITATIVA
<b>LATTE di massa (MEDIA)</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>LATTE singole mucche (MEDIA sui dieci campioni)</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>Mangime di soia (MEDIE)</b>	Prelievo I: 91,91%  Prelievo II: 91,91%	0,01%  -	Dairy Over Top 0,2%  -	Nucleo PAM 0,80%  -	Nucleo PAM <LOQ  -	Mangime A: 90% Nucleo proteico <LOQ  -
<b>Mangime di mais (MEDIE)</b>	n.a.	n.a.	Starch Gold <LOQ	negativo	negativo	negativo

TABELLA 3

## Rese di estrazione per il latte

## AZIENDA I primo prelievo (Stabulazione fissa; mangime convenzionale)

	Rese di estrazione metodo (CTAB) 1*	Rese di estrazione metodo (QIAGEN) 2**	Rese di estrazione metodo 3***	Rese di estrazione metodo 4****	Rese di estrazione metodo (NUCLOSPIN) 5*****	Rese di estrazione metodo 6*****
Crema massa	55,2 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Pellet massa	1,3 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Siero massa	<LOD	2,8 ng/µl	18,4 ng/µl			
Mucca 1 siero	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	12,4 ng/µl	
Mucca 2 siero	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	41,7 ng/µl	
Mucca 3 siero	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	96,8 ng/µl	
Mucca 4 siero	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	123,3 ng/µl	
Mucca 5 siero	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	200,0 ng/µl	
Mucca 1 pell.	n.a.	n.a.	5,3 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 2 pell.	n.a.	n.a.	0,4 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 3 pell.	n.a.	n.a.	2,1 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 4 pell.	n.a.	n.a.	2,1 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 5 pell.	n.a.	n.a.	3,7 ng/µl	n.a.	n.a.	

n.a. non analizzato

\*Metodo 1: CTAB partendo da 50ml di latte crudo.

\*\*\*Metodo 3: CTAB partendo da 10ml di siero+7,5ml di CTAB+O.N. a 56°C

\*\*\*\*Metodo 4: 1200µl di CTAB+300µl di PK e O.N. a 56°C.

\*\*\*\*\*Metodo 5: estrazione DNA con Kit Nucleospin partendo da 30

\*\*\*\*\*Metodo 6: precipitazione con acetato di sodio+ CTAB

LOD= 0,005 ng/µl

TABELLA 4

## Rese di estrazione per il latte

## AZIENDA I, secondo prelievo (Stabulazione fissa; mangime convenzionale)

	Rese di estrazione metodo (CTAB) 1*	Rese di estrazione metodo (QIAGEN) 2**	Rese di estrazione metodo 3***	Rese di estrazione metodo 4****	Rese di estrazione metodo (NUCLOSPIN) 5*****	Rese di estrazione metodo 6*****
Massa	n.a.	n.a.	13,9 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 1	n.a.	n.a.	8,7 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 2	n.a.	n.a.	7,8 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 3	n.a.	n.a.	1,4 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 4	n.a.	n.a.	2,2 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 5	n.a.	n.a.	0,5 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 6	n.a.	n.a.	1,1 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 7	n.a.	n.a.	0,7 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 8	n.a.	n.a.	0,5 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 9	n.a.	n.a.	0,4 ng/µl	n.a.	n.a.	
Mucca 10	n.a.	n.a.	0,5 ng/µl	n.a.	n.a.	
Massa	134,4 ng/µl	n.a.	48,2 ng/µl	n.a.	15,4 ng/µl	
Mucca 1	8,1 ng/µl	n.a.	6,4 ng/µl	n.a.	38,1 ng/µl	
Mucca 2	10,9 ng/µl	n.a.	1,8 ng/µl	n.a.	70,9 ng/µl	
Mucca 3	21,1 ng/µl	n.a.	8,2 ng/µl	n.a.	15,3 ng/µl	
Mucca 4	13,9 ng/µl	n.a.	3,2 ng/µl	n.a.	43,9 ng/µl	
Mucca 5	36,3 ng/µl	n.a.	14,9 ng/µl	n.a.	13,7 ng/µl	
Mucca 6	12,2 ng/µl	n.a.	3,3 ng/µl	n.a.	8,5 ng/µl	
Mucca 7	33,2 ng/µl	n.a.	13,8 ng/µl	n.a.	4,2 ng/µl	
Mucca 8	20,7 ng/µl	n.a.	7,9 ng/µl	n.a.	68,0 ng/µl	
Mucca 9	27,1 ng/µl	n.a.	10,7 ng/µl	n.a.	5,2 ng/µl	
Mucca 10	19,9 ng/µl	n.a.	2,5 ng/µl	n.a.	4,8 ng/µl	
Massa	4,8 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	8,2 ng/µl	n.a.
Mucca 1	2,7 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	8,3 ng/µl	n.a.
Mucca 2	3,5 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	15,9 ng/µl	n.a.
Mucca 3	2,3 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	19,2 ng/µl	n.a.
Mucca 4	2,5 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	14,7 ng/µl	n.a.
Mucca 5	31,1 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	27,1 ng/µl	n.a.
Mucca 6	5,7 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	8,2 ng/µl	n.a.
Mucca 7	10,8 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	15,5 ng/µl	n.a.
Mucca 8	3,4 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	82,5 ng/µl	n.a.
Mucca 9	3,4 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	14,1 ng/µl	n.a.
Mucca 10	43,5 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	17,0 ng/µl	n.a.

n.a. non analizzato

\*Metodo 1: CTAB partendo da 50ml di latte crudo.

\*\*\*Metodo 3: CTAB partendo da 10ml di siero+7,5ml di CTAB+O.N. a 56°C

\*\*\*\*Metodo 4: 1200µl di CTAB+300µl di PK e O.N. a 56°C.

\*\*\*\*\*Metodo 5: estrazione DNA con Kit Nucleospin partendo da 300µl

\*\*\*\*\*Metodo 6: precipitazione con acetato di sodio+ CTAB

LOD= 0,005 ng/µl

TABELLA 5							
Rese di estrazione per il latte AZIENDA II (Stabulazione semi fissa; mangime biologico)							
		Rese di estrazione metodo (CTAB) 1*	Rese di estrazione metodo (QIAGEN) 2**	Rese di estrazione metodo 3***	Rese di estrazione metodo 4****	Rese di estrazione metodo (NUCLOSPI N) 5*****	Rese di estrazione metodo 6*****
Campioni a stabulazione semi fissa	BIOL.	Crema massa	4,7 ng/µl	n.a	n.a	n.a	n.a
		Pellet massa	142,1 ng/µl	n.a	n.a	n.a	n.a
		Siero massa	<LOD	2,2 ng/µl	31,0 ng/µl	n.a	n.a
		Mucca 1 pell.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6,7 ng/µl
		Mucca 2 pell.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3,8 ng/µl
		Mucca 3 pell.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	62,4 ng/µl
		Mucca 4 pell.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	68,2 ng/µl
		Mucca 5 pell.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,1 ng/µl
		Mucca 1 siero n.a.		n.a	<LOD	n.a	4,8 ng/µl
		Mucca 2 siero n.a.		n.a	<LOD	n.a	3 ng/µl
		Mucca 3 siero n.a.		n.a	<LOD	n.a	2,6 ng/µl
		Mucca 4 siero n.a.		n.a	<LOD	n.a	9,7 ng/µl
		Mucca 5 siero n.a.		n.a	<LOD	n.a	2,9 ng/µl

n.a. non analizzato  
 \*Metodo 1: CTAB partendo da 50ml di latte crudo.  
 \*\*\*Metodo 3: CTAB partendo da 10ml di siero+7,5ml di CTAB+O.N. a 56°C  
 \*\*\*\*Metodo 4: 1200µl di CTAB+300µl di PK e O.N. a 58°C.  
 \*\*\*\*\*Metodo 5: estrazione DNA con Kit Nucleoepin partendo da 300µl  
 \*\*\*\*\*Metodo 6: precipitazione con acetato di sodio+ CTAB  
 LOD= 0,005 ng/µl

TABELLA 6							
Rese di estrazione per il latte AZIENDA III CONV. CHE NON USA MANGIME OGM							
		Rese di estrazione metodo (CTAB) 1*	Rese di estrazione metodo (QIAGEN) 2**	Rese di estrazione metodo 3***	Rese di estrazione metodo 4****	Rese di estrazione metodo (NUCLOSPI N) 5*****	Rese di estrazione metodo 6*****
Campioni a stabulazione fissa	SIERO estraz I	Massa	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	20,3 ng/µl
		Mucca 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	11,1 ng/µl
		Mucca 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	7,9 ng/µl
		Mucca 3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	28,9 ng/µl
		Mucca 4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3,2 ng/µl
		Mucca 5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	10,0 ng/µl
		Mucca 6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	35,4 ng/µl
		Mucca 7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	8,0 ng/µl
		Mucca 8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	34,9 ng/µl
		Mucca 9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	56,4 ng/µl
	Mucca 10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	28,6 ng/µl	
	SIERO estraz II	Massa	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	26,3 ng/µl
		Mucca 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	29,3 ng/µl
		Mucca 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	22,7 ng/µl
		Mucca 3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	69,8 ng/µl
		Mucca 4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	53,6 ng/µl
		Mucca 5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	16,7 ng/µl
		Mucca 6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	34,5 ng/µl
		Mucca 7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	34,6 ng/µl
		Mucca 8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	58,8 ng/µl
Mucca 9		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	11,9 ng/µl	
Mucca 10	n.a.		n.a.	n.a.	41,7 ng/µl		

n.a. non analizzato  
 \*Metodo 1: CTAB partendo da 50ml di latte crudo.  
 \*\*\*Metodo 3: CTAB partendo da 10ml di siero+7,5ml di CTAB+O.N. a 56°C  
 \*\*\*\*Metodo 4: 1200µl di CTAB+300µl di PK e O.N. a 58°C.  
 \*\*\*\*\*Metodo 5: estrazione DNA con Kit Nucleoepin partendo da 300µl  
 \*\*\*\*\*Metodo 6: precipitazione con acetato di sodio+ CTAB  
 LOD= 0,005 ng/µl

TABELLA 7

Rese di estrazione per il latte

AZIENDA IV NON OGM CON SALA MUGITURA LONTANO DALLA PREPARAZIONE ALIMENTI

		Rese di estrazione metodo 1*	Rese di estrazione metodo 2**	Rese di estrazione metodo 3***	Rese di estrazione metodo 4****	Rese di estrazione metodo 5*****	Rese di estrazione metodo 6*****
SIERO estraz I	Massa 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	16,1 ng/µl	
	Massa 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	12,8 ng/µl	
	Mucca 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	17,4 ng/µl	
	Mucca 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	27,1 ng/µl	
	Mucca 3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	21,9 ng/µl	
	Mucca 4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	10,5 ng/µl	
	Mucca 5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,6 ng/µl	
	Mucca 6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	5,1 ng/µl	
	Mucca 7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6,6 ng/µl	
	Mucca 8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	23,2 ng/µl	
SIERO estraz II	Mucca 9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	4,0 ng/µl	
	Mucca 10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3,2 ng/µl	
	Massa 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	12,0 ng/µl	
	Massa 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2,4 ng/µl	
	Mucca 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	8,2 ng/µl	
	Mucca 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6,9 ng/µl	
	Mucca 3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	8,5 ng/µl	
	Mucca 4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	10,5 ng/µl	
	Mucca 5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	6,3 ng/µl	
	Mucca 6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	16,1 ng/µl	
SIERO estraz III	Mucca 7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3,5 ng/µl	
	Mucca 8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	8,9 ng/µl	
	Mucca 9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	10,8 ng/µl	
	Mucca 10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	4,5 ng/µl	
	Massa 1	9,8 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	3,6 ng/µl	
	Massa 2	9,1 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	10,9 ng/µl	
	Mucca 1	88,1 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	2,5 ng/µl	
	Mucca 2	61,1 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	3,8 ng/µl	
	Mucca 3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	4,9 ng/µl	
	Mucca 4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	4,1 ng/µl	
Mucca 5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	25,2 ng/µl		
Mucca 6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	22,0 ng/µl		
Mucca 7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	29,4 ng/µl		
Mucca 8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	13,4 ng/µl		
Mucca 9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,6 ng/µl		
Mucca 10	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,6 ng/µl		

n.a. non analizzato

\*Metodo 1: CTAB partendo da 50ml di latte crudo

\*\*\*Metodo 3: CTAB partendo da 10ml di siero+7,5ml di CTAB+O.N. a 56°C

\*\*\*\*Metodo 4: 1200µl di CTAB+300µl di PK e O.N. a 56°C.

\*\*\*\*\*Metodo 5: estrazione DNA con Kit Nucleospin partendo da 300µl

\*\*\*\*\*Metodo 6: precipitazione con acetato di sodio+ CTAB

LCD= 0,005 ng/µl

TABELLA 8

Rese di estrazione per il latte  
AZIENDA V (Mangime non OGM/ sala mungitura vicino alla sala preparazione alimenti)

		Rese di estrazione metodo 1*	Rese di estrazione metodo	Rese di estrazione metodo	Rese di estrazione metodo	Rese di estrazione e metodo	Rese di estrazione e metodo
SIERO	Massa	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 1	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 2	1,2 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 3	17,6 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 4	1,7 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 5	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 6	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 7	23,6 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 8	60,8 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 9	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 10	0,4 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Campioni a stabulazione libera	Massa	55,5 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 1	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 2	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 3	22,8 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 4	17,7 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	PELLET	Mucca 5	4,7 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 6	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 7	187,9 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 8	0,1 ng/µl	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 9	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Mucca 10	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
SIERO	Massa 1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	negativo
	Massa 2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	20,8ng/µl

n.a. non analizzato

\*Metodo 1: CTAB partendo da 50ml di latte crudo.

\*\*\*Metodo 3: CTAB partendo da 10ml di siero+7,5ml di CTAB+O.N. a 56°C

\*\*\*\*Metodo 4: 1200µl di CTAB+300µl di PK e O.N. a 56°C.

\*\*\*\*\*Metodo 5: estrazione DNA con Kik Nucleospin partendo da 300µl d

\*\*\*\*\*Metodo 6: precipitazione con acetato di sodio+ CTAB

LOD= 0,005 ng/µl

TABELLA 9

## Rese di estrazione per il latte

AZIENDA VI (Mangime convenzionale/ sala mungitura vicino alla sala preparazione alimenti)

	Rese di estrazione metodo 1*	Rese di estrazione metodo 2**	Rese di estrazione e metodo 3***	Rese di estrazione e metodo 4****	Rese di estrazione e metodo 5*****	Rese di estrazione e metodo 6*****
Massa 1	2,4 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Massa 2	6,1 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 1a	6 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 1b	3,8 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 2a	19,3 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 2b	21,9 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 3a	66,5 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 3b	67,1 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 4a	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 4b	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 5a	35,4 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 5b	38,9 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 6a	10,1 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 6b	16,5 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 7a	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 7b	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 8a	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 8b	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 9a	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 9b	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 10a	negativo	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mucca 10b	2,1 ng/ul	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. non analizzato

\*Metodo 1: CTAB partendo da 50ml di latte crudo.

\*\*\*Metodo 3: CTAB partendo da 10ml di siero+7,5ml di CTAB+O.N. a 56°C

\*\*\*\*Metodo 4: 1200ul di CTAB+300ul di PK e O.N. a 56°C.

\*\*\*\*\*Metodo 5: estrazione DNA con Kit Nucleospin partendo da 300ul

\*\*\*\*\*Metodo 6: precipitazione con acetato di sodio+ CTAB

LOD= 0,005 ng/ul