



SOCIETÀ ITALIANA DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO VETERINARIA

XIX Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

VOLUME DEGLI ABSTRACT

**Matera 23-25 Ottobre 2019
Hotel MH Matera**

**SOCIETÀ ITALIANA
DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO VETERINARIA**

XIX Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.

Matera

Hotel MH Matera

23-25 Ottobre 2019

VOLUME DEGLI ATTI

INDICE

PREFAZIONE	4
COMITATI	5
RELAZIONI AD INVITO	7
CORSO NGS	21
SIMPOSIO	26
SIDILV YOUNG	32
COMUNICAZIONI LIBERE	40
POSTER 01 SICUREZZA ALIMENTARE	101
POSTER 02 SANITÀ ANIMALE	252
POSTER 03 ZONOSI/MALATTIE TRASMESSE DA VETTORI	425
POSTER 04 BENESSERE ANIMALE	458
POSTER 05 EPIDEMIOLOGIA/ANALISI E COMUNICAZIONE DEL RISCHIO	467
POSTER 06 IMMUNOLOGIA E VACCINI	511
POSTER 07 CONTAMINATI AMBIENTALI	527
INDICE DEGLI AUTORI	541

PREFAZIONE

Cari soci, cari colleghi,

l'anno scorso, a Perugia, il Convegno nazionale SIDILV ha compiuto la maggiore età, cambiando abito per festeggiare la sua diciottesima edizione. La nuova struttura del convegno, non più articolato in sessioni parallele ma che si svolge seguendo il filo della filiera alimentare, ha ottenuto l'apprezzamento dei soci, come dimostrano i numerosissimi contributi presentati per questa nostra diciannovesima edizione, nell'ambito della quale abbiamo quindi deciso, assieme ai colleghi del Consiglio Direttivo, di mantenere la medesima impostazione.

Il fatto di avere tutte le presentazioni in plenaria ha l'indubbio vantaggio di una più ampia condivisione dei lavori e delle tematiche presentate, ma comporta una notevole riduzione del numero dei lavori che possono essere selezionati come presentazioni orali. Questa scelta, operata dal Comitato Scientifico, è difficilissima perché la qualità dei lavori negli anni è andata sempre aumentando, e quindi mi scuso fin d'ora, anche a nome dei Colleghi, per avere dovuto derubricare a poster molti contributi proposti come presentazioni orali e che avrebbero certamente meritato tale posizione.

Oltre ai contributi dei soci, avremo relazioni ad invito di assoluto rilievo, che introdurranno le sessioni e ci presenteranno argomenti strategici per la nostra professione, ed alcuni interessanti simposi organizzati dagli sponsor.

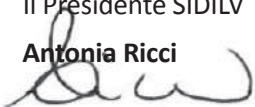
Eccoci dunque a Matera, Capitale Europea della Cultura 2019, per condividere le novità tecnico scientifiche della diagnostica di laboratorio veterinaria, ma anche per conoscere nuovi colleghi, ritrovare "vecchi" amici e fare rete, fondamentale volano anche per la crescita professionale, soprattutto dei giovani ai quali SIDILV dedica sempre un'attenzione particolare. Vi invito quindi a partecipare con puntualità ed attenzione alle sessioni scientifiche, e a godervi gli eventi sociali, come la visita guidata alla splendida Matera e la cena in una masseria tradizionale.

Grazie di cuore agli amici e colleghi dei Comitati Direttivo, Scientifico ed Organizzatore per l'impegno nell'organizzazione del convegno e nella gestione della Società, e agli Sponsor per l'indispensabile supporto.

Buon Convegno!

Il Presidente SIDILV

Antonia Ricci



CONSIGLIO DIRETTIVO S.I.Di.L.V.

Antonia Ricci, Presidente
Giovanni Pezzotti, Vicepresidente
Nicola Decaro, Segretario
Giovanna Fusco, Tesoriere
Andrea Caprioli, Consigliere
Stefano Morabito, Consigliere
Antonio Parisi, Consigliere
Simone Peletto, Revisore dei Conti
Stefano Reale, Revisore dei Conti
Davide Lelli, Revisore dei Conti
Elena Bozzetta, Past President

COMITATO SCIENTIFICO

Barbara Consenti
IZS Puglia e della Basilicata

Elisa Goffredo
IZS Puglia e della Basilicata

Eugenio Chiaravalle
IZS Puglia e della Basilicata

Nicola Cavaliere
IZS Puglia e della Basilicata

Domenico Otranto
Uniba

Canio Buonavoglia
Uniba

Vito Martella
Uniba

Gabriella Elia
Uniba

COMITATO ORGANIZZATORE

Antonio Parisi
IZS Puglia e della Basilicata

Laura Latorre
IZS Puglia e della Basilicata

Gianfranco Santagada
IZS Puglia e della Basilicata

Nicola Decaro
Uniba

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA e PROVIDER ECM



Via Marchesi, 26/D - 43126 Parma
Tel. 0521 290191 - Fax 0521 291314 - e-mail: sidilv@mvcongressi.it
www.sidilv.org - www.mvcongressi.com

SVILUPPO DI METODICHE NGS PER LA CARATTERIZZAZIONE DI OGM NON AUTORIZZATI: PRIMI RISULTATI

Marchesi U.*^[1], Piazza S.^[2], De Marchis M.L.^[1], Cestaro A.^[2], Pindo M.^[2], Tofani S.^[1], Verginelli D.^[1], Bonini P.^[1], Fusco C.^[1], Malnoy M.^[2], Moser C.^[2], Dalla Costa L.^[2]

^[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M.Aleandri" Centro di referenza nazionale per la ricerca di organismi geneticamente modificati (CROGM) ~ roma ~ Italy, ^[2]Fondazione Edmund Mach – Centro Ricerca e Innovazione ~ san michele all'adige (TN) ~ Italy

Keywords: unauthorized GMO, NGS, transgenic

SUMMARY:

Current GMO detection systems have limited abilities to detect unauthorized genetically modified organisms (UGMs). One of the components of safety assessment is molecular characterization at DNA level, which helps to determine the copy number, integrity and stability of a transgene, characterize the integration site within the flanking regions. The emergence of next-generation sequencing (NGS) technologies has provided highly sensitive and cost- and labor-effective alternative for molecular characterization compared to traditional analysis. The aim of the present study was to develop NGS techniques based on Illumina platform in order to identify UGMs and better characterize new GM events that can implement the information deriving from current laboratory analyses. The preliminary study of A5547-127 soy event showed that NGS was successful in characterizing the transgenic event and the surroundings of the insertion site.

INTRODUZIONE:

Dal primo anno della loro commercializzazione nel 1996, lo sviluppo di colture geneticamente modificate (GM) è cresciuto costantemente in termini di aree coltivate, specie vegetali coinvolte e diversità dei costrutti. Fino al 2017 si contano, nel mondo, 498 eventi GM autorizzati derivanti da 29 specie vegetali transgeniche (6), di cui 5 autorizzate in Europa (3). L'UE ha istituito un quadro normativo per regolare la presenza di organismi GM (OGM) sul mercato e nella catena di produzione, che stabilisce un'unica procedura di autorizzazione dell'evento GM per tutti gli usi previsti. Il richiedente deve presentare un dossier con informazioni sull'evento GM e sui prodotti da lui derivati, nonché dati scientifici sulla sua sicurezza per la salute umana e animale e per l'ambiente (2,8). Nonostante ciò resta comunque alto il rischio d'immissione nella catena alimentare di OGM non autorizzati (UGM) provenienti dal mercato internazionale. Pertanto il CROGM, Centro di Referenza Nazionale per la ricerca di OGM, si è posto l'obiettivo di migliorare la ricerca e caratterizzazione di eventi UGM anche in collaborazione con la Fondazione Edmund Mach (FEM) per la messa a punto di protocolli sperimentali e l'analisi dei dati generati.

I metodi di ricerca specifici per UGM sono ancora limitati, soprattutto a causa dell'assenza di informazioni di sequenza e per la difficile reperibilità di materiali di riferimento.

Recentemente sono stati sviluppati metodi basati su sequenziamento NGS per la ricerca di nuovi eventi non autorizzati che possono essere utilizzati per caratterizzare la sequenza del transgene, nonché delle sequenze fiancheggianti al 5' ed al 3'.

L'ipotesi dietro il presente studio è che l'implementazione delle analisi di sequenza con conseguente messa a punto di metodiche che utilizzano piattaforme NGS permettano, in supporto alle metodiche di routine attualmente in uso, una migliore discriminazione dei diversi eventi e rilevino la presenza di eventi altrimenti non identificati e non autorizzati al commercio sul territorio europeo.

Lo scopo del presente lavoro è lo sviluppo di una strategia analitica su piattaforma NGS Illumina che, partendo da elementi genici comunemente ricercati in fase di screening, ad esempio il promotore costi-

tutivo del virus del mosaico del cavolfiore CaMV-35S (p35S), permetta di caratterizzare il costrutto genico utilizzato per la trasformazione e il sito d'inserzione del DNA esogeno all'interno del genoma della specie ospite. Con le informazioni di sequenza ottenute si procederà allo sviluppo di saggi in real-time PCR per la rilevazione e quantificazione nei prodotti commerciali di questi nuovi eventi caratterizzati.

MATERIALI E METODI:

L'analisi dei costrutti relativi agli eventi GM è stata effettuata attraverso consultazione della piattaforma Euginius (5) integrando le informazioni con quelle della banca dati dell'NCBI.

Per l'esperimento pilota è stato selezionato il target p35S. È stato utilizzato un oligonucleotide specifico per il p35S, disponibile presso la FEM. L'appaiamento dell'oligonucleotide è stato testato in silico sui costrutti GM disponibili sui database pubblici dell'NCBI, della piattaforma Euginius e dell'EURL-GMFF (4).

Gli eventi GM sono stati successivamente selezionati in base ad alcuni requisiti: appaiamento perfetto con l'oligonucleotide selezionato, presenza di una o più copie del promotore p35S a singolo o doppio enhancer, disponibilità della sequenza di riferimento dell'inserito transgenico con le regioni genomiche fiancheggianti, appartenenza a diverse specie vegetali per testare la risposta dei DNA genomici alla sonicazione e disponibilità di materiale di riferimento certificato 100% GM.

Il DNA è stato estratto con il kit ION-Force DNA extractor FAST (GENE-RON), quantificato al biofotometro ed inviato presso la FEM per le fasi di preparazione delle library e sequenziamento su piattaforma MiSeq Illumina. Il DNA genomico è stato sonicato, le estremità del DNA riparate enzimaticamente e il DNA purificato con biglie magnetiche. Di seguito sono stati aggiunti alle estremità dei frammenti gli adattatori per il "genome walking" tramite ligazione. La library è stata generata tramite arricchimento mediante due successive reazioni di PCR e l'analisi preliminare delle reads è stata effettuata sulla piattaforma Geneious, preceduta dalle fasi di trimming ed assemblaggio sulla piattaforma Galaxy, EU (1).

RISULTATI E DISCUSSIONE:

Le analisi in silico hanno mostrato un appaiamento perfetto tra l'oligonucleotide specifico per il p35S e quasi tutti i costrutti GM analizzati. Nello specifico l'oligonucleotide riconosce la regione dell'enhancer del promotore 35S del CaMV che, in alcuni costrutti, risulta duplicata.

Per lo studio preliminare è stato selezionato il materiale di riferimento AOCs 100% relativo all'evento di soia A5547-127.

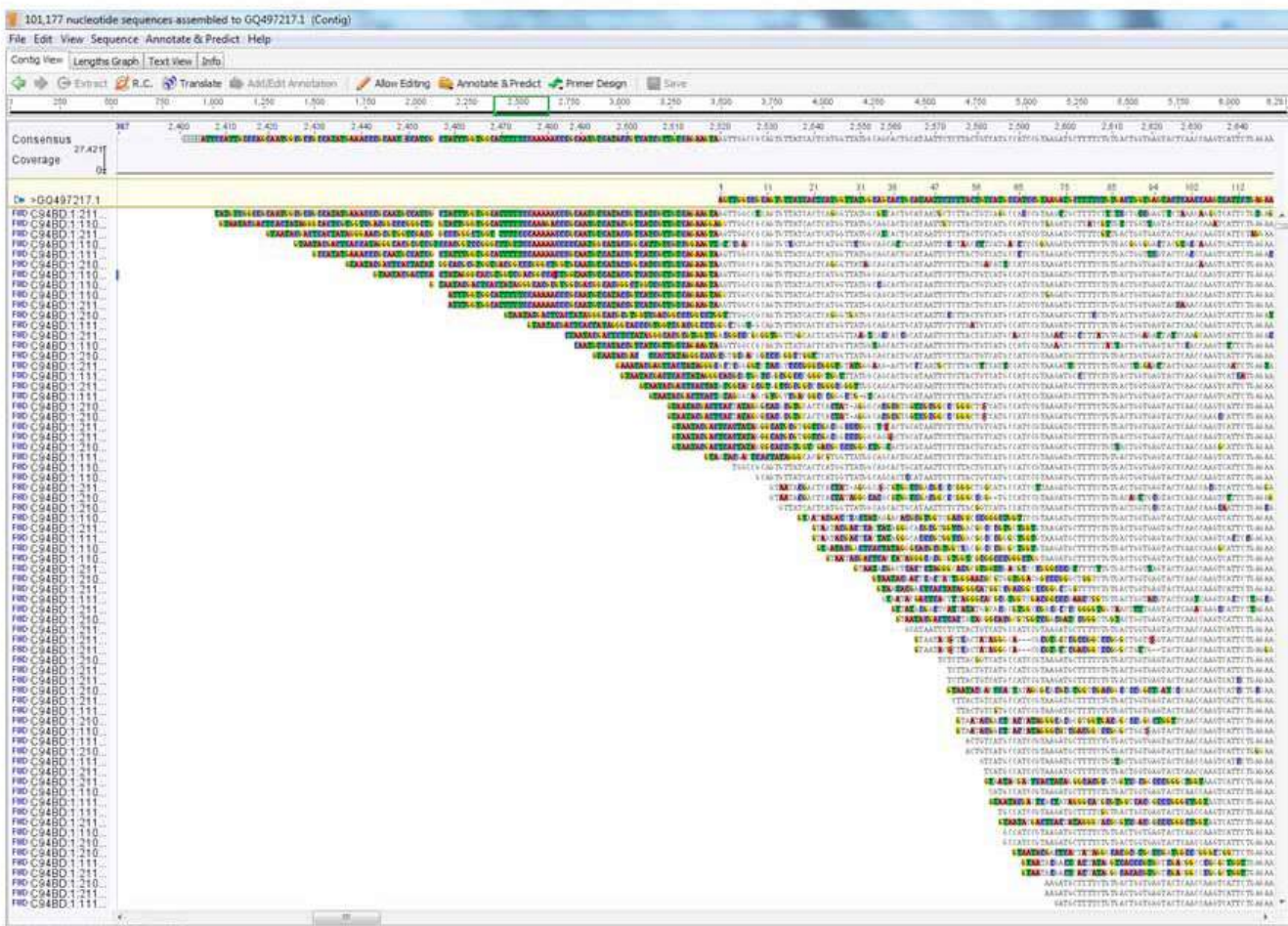
Le reads paired end prodotte sono state rifinite sulla piattaforma Galaxy e l'analisi del quality score ha messo in evidenza circa 10100 sequenze totali di lunghezza media comprese tra 2 e 301 nucleotidi per R1 e R2, con un contenuto in GC del 50%.

Le reads R1 si allineano all'interno del costrutto A5547-127 (GQ497217.1), mentre le reads R2 coprono quasi tutto il costrutto, compresa la giunzione al 5' (figura 1).

Per ciascun evento GM approvato nell'UE è presente una metodica real-time quantitativa evento-specifica fornita obbligatoriamente dal

richiedente autorizzazione e validata dal laboratorio di riferimento Europeo per alimenti e mangimi GM (EURL-GMFF). Visto tuttavia il crescente numero di piante ed eventi GM potenzialmente presenti nei campioni da analizzare, queste analisi diventano sempre più costose e di lunga durata. Più impegnativa è la ricerca e l'identificazione di eventi UGM, in quanto solo per alcuni di essi sono disponibili le informazioni di sequenza necessarie per disegnare un saggio evento-specifico (7). Le metodiche NGS sono invece caratterizzate da rapidità, affidabilità e costi limitati consentendo l'analisi in parallelo di diversi campioni.

Negli ultimi anni le metodiche NGS si stanno rivelando efficaci per la caratterizzazione dei transgeni. Ad oggi non permettono ancora un flusso di lavoro standardizzato, soprattutto a causa delle conoscenze bioinformatiche richieste dalla quantità di dati prodotti. Lo sviluppo e la diffusione di piattaforme ad interfaccia grafica per l'analisi dei dati potranno rendere più snella la produzione dei risultati e queste metodiche potranno integrare strutturalmente l'attuale routine diagnostica per la ricerca di OGM in matrici agroalimentari.



Allineamento delle reads R2 alla sequenza di riferimento del costrutto A5547-127 (GQ497217.1)

BIBLIOGRAFIA:

1. Afgan E., et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update, Nucleic Acids Research, Volume 46, Issue W1, 2 July 2018, Pages W537–W544
2. Direttiva 2001/18/Ce Del Parlamento Europeo e Del Consiglio del 12 marzo 2001
3. http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
4. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/>

5. <http://www.euginius.eu/>
6. ISAAA Briefs. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017. No. 53 (2017)
7. Liang C., et al. Detecting authorized and unauthorized genetically modified organisms containing vip3A by real-time PCR and next-generation sequencing. Anal Bioanal Chem. 2014 Apr;406(11):2603-11.
8. Regolamento (CE) n. 1829/2003 Del Parlamento Europeo e Del Consiglio del 22 settembre 2003