

**PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2021”**  
**RELAZIONE FINALE**

**N. identificativo progetto: IZS LT 14/21 RC**

**Progetto presentato da:**

**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE**

**LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”**

**Area tematica: SICUREZZA ALIMENTARE**

**Titolo del progetto: Sviluppo di protocolli analitici per la rilevazione ed identificazione di animali geneticamente modificati finalizzata al controllo ufficiale di OGM non autorizzati nella filiera alimentare**

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

**Responsabile Scientifico: Daniela Verginelli**

## SINTESI

### ***Sviluppo di protocolli analitici per la rilevazione ed identificazione di animali geneticamente modificati finalizzata al controllo ufficiale di OGM non autorizzati nella filiera alimentare***

Parole chiave: Organismi Geneticamente Modificati (OGM), animali geneticamente modificati (animali GM), Polymerase Chain Reaction (PCR)

Il progetto di ricerca si è articolato in diverse fasi, ognuna delle quali ha previsto il coinvolgimento dell'Unità Operativa coinvolta, U.O.1 IZSLT. Inizialmente, tramite uno studio in letteratura, è stata compilata una lista di animali GM potenzialmente prossimi all'impiego nel settore alimentare, comprendente gli elementi genici esogeni riportati per ciascun evento. Successivamente è stata valutata, sia in letteratura che in database pubblici, la disponibilità di saggi di screening e/o di identificazione, in grado di rilevare animali geneticamente modificati. Le informazioni recuperate precedentemente sono state impiegate per effettuare analisi *in silico*; in particolare, per ogni animale GM individuato, sono state confrontate *in silico*, laddove presenti, le sequenze nucleotidiche dei primer specifici per il costrutto transgenico con la sequenza del costrutto stesso, ottenendo così un prodotto amplificato atteso eseguendo una PCR in laboratorio. Confrontando globalmente le normative legate agli animali GM e considerando quelli che potrebbero essere i maggiori flussi di importazioni in campo alimentare nell'Unione Europea, sono stati presi in considerazione i prodotti di acquacoltura focalizzando l'attenzione sulla Tilapia, detta anche Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), appartenente alla famiglia tassonomica delle Cichlidae e ampiamente consumata in America, Asia e Africa. Nel 2018, una versione editata di Tilapia (FLT-01) sviluppata da Acquabounty ed Intrexon, è caratterizzata da una delezione knockout di 26 bp nel gene della miostatina, migliorando notevolmente la crescita dell'animale e senza introdurre materiale genico esogeno. Legislativamente è stata classificata come NON-GM sia in Argentina che in Brasile rispettivamente dalla Commissione Consultiva Nazionale Argentina sulle Biotecnologie (CONABIA) e dalla Commissione tecnica nazionale per la biosicurezza (CTNBIO). La sequenza di FLT-01 non è reperibile, ma esiste il patent US-WO2019195679A1, dove vengono mostrate possibili modifiche knockout negli esoni 1 e 3 del gene miostatina.

A tale scopo sono stati disegnati *in silico* dei metodi di PCR per identificare le varianti editate e la versione WT in entrambi gli esoni della miostatina. Tali metodi sono stati testati con PCR end point.

## SUMMARY

### ***Development of analytical protocols for the detection and identification of genetically modified animals aiming at the official control of not authorised GMOs in the food chain***

Key words: Genetically Modified Organisms (GMOs), Genetically Modified animals (GM animals), Polymerase Chain Reaction (PCR)

The research project has been divided into several phases, each of which involved the Operative Unit 1, O.U.1 IZSLT. Firstly, through a literature search, a list has been drafted including all of GM animals likely involved in the food chain and collecting all of exogenous genetic elements for each GM event. Secondly, assays of screening have been looked up in both scientific literature and public databases in order to have means of detection for GM animals. Thanks to this information, an *in silico* study has been carried out, furthermore for each selected GM animal, an alignment has been performed using primer sequences and the target region/ transgenic construct (when available) obtaining an expected amplicon from a hypothetical PCR reaction. Checking out regulatory framework around the world, currently there is no food and feed derived from GM animals authorised for sale in the EU and no applications have yet been received by European food safety authority (EFSA).

However, a GM salmon is approved for consumption in the US, Canada and Brazil. The AquAdvantage Salmon has been genetically modified to grow faster than its non-GM Atlantic salmon counterpart. Taking into account the GM animals already developed in the world and considering the most expected imports flows of food chain in future, those related to aquaculture have been considered focusing on Tilapia (*Oreochromis niloticus*), a member of the taxonomic family of Cichlidae and greatly eaten in America, Asia and Africa. In 2018, a gene edited Tilapia (FLT-01), developed by Acquabounty and Intrexon, contains a knockout deletion of 26 bp in the myostatin gene, improving the growth of the fish without adding exogenous genetic elements. Legally, it has been classified as NON-GM in both Argentina and Brasil by the National Advisory Commission on Biotechnology (CONABIA) and CTNBIO, respectively. The sequence of FLT-01 is not available online, however there is the patent US-WO2019195679A1 which collects likely gene edited knockout modifications in exons 1 and 3 of myostatin gene. New methods have been designed *in silico* and tested in endpoint PCR in order to detect both WT and variant mutated versions of the exons involved.