



Confronto quali-quantitativo tra DNA transgenico di mais MON810 e proteina codificata Cry1Ab - Quality and quantity comparison between DNA transgenic maize MON810 and Cry1Ab encoded protein

Martina Torricelli, Elisa Pierboni, Gloria Raquel Tovo, Cristina Rondini

Abstract. Nowadays laboratories for the official control of GMO have the task to detect and to quantify quickly and efficiently the transgenic events in food and feed, due to the increasing in the world of the number of authorized GMO and/or unauthorized (UGM). Real-time PCR assay is considered the *gold standard* for the control of GMO and UGM, in order to verify the correct labeling. However some instruments and techniques allow a rapid analysis of GM proteins also in field. In this paper our laboratory, assigned to GMO official control, tested simultaneously some raw materials containing maize with two approaches: the one based on DNA detection by means of amplification in fast real-time PCR for the determination of MON810 GM event, the other based on detection of Cry1Ab protein codified by MON810, with lateral flow technique.

Riassunto. Ad oggi i laboratori deputati al controllo ufficiale degli OGM hanno il compito di rilevare e di quantificare velocemente ed efficientemente gli eventi transgenici negli alimenti ad uso umano ed animale e nelle sementi, dato il continuo incremento nel mondo del numero di OGM autorizzati e/o non autorizzati (UGM), al fine di verificarne la corretta etichettatura. La PCR real-time è considerata la metodica *gold standard* per il controllo degli OGM e UGM, in quanto il DNA è una molecola difficilmente degradabile ed è reperibile in tutte le cellule di un organismo, ma esistono anche alcuni strumenti e tecniche che consentono un'analisi veloce, anche in campo, per valutare la presenza di proteine derivanti da modifiche genetiche. In questo lavoro, il nostro laboratorio ha testato parallelamente alcuni campioni di mais mediante due approcci: uno basato sul rilevamento del DNA, tramite amplificazione in fast PCR real-time per la determinazione dell'evento GM MON810 e l'altro basato sul rilevamento della proteina transgenica Cry1Ab, tramite l'utilizzo della tecnica *lateral flow*. I dati ottenuti con i due metodi sono risultati sovrapponibili per quanto riguarda l'analisi qualitativa, mentre sono state rilevate delle discordanze in quella quantitativa, dovute ad un'espressione proteica non uniforme né costante, contrariamente a quanto accade per il DNA genomico.

Introduzione

Il crescente aumento degli eventi GM autorizzati nel mondo (ISAAA, 2014) richiede un continuo sviluppo di metodiche sensibili e accurate, attuabili dai Laboratori in tempi rapidi ed a costo contenuto.

Il *gold standard* per il controllo ufficiale degli OGM è la tecnica PCR real-time, che permette di ottenere risultati qualitativi e quantitativi da un'ampia gamma di matrici (EUR24526EN, 2011; UNI EN ISO 21570:2013, GU n°281/2003).

In questo lavoro il Laboratorio OGM e Igiene dell'Ambiente dell'IZSUM, facente parte del NILO (Network Italiano dei Laboratori deputati al controllo ufficiale degli OGM), ha confrontato i risultati di analisi effettuate su campioni di granella di mais in PCR real-time con quelli ottenuti dagli stessi campioni utilizzando un metodo di analisi rapida, facile da interpretare ed utilizzabile

anche da personale non altamente specializzato, ovvero un immunosaggio basato sulla tecnologia del flusso laminare laterale o “*Lateral Flow Test*” (LFT). Tale sistema è stato adottato in questo studio allo scopo di verificare, per ogni campione, la rispondenza dei risultati qualitativi e quantitativi ottenuti dal rilevamento di DNA con quelli relativi alla proteina transgenica Cry1Ab derivata da *Bacillus thuringensis* subsp. *Kurstaki* ed endotossica per i lepidotteri: essa conferisce infatti al mais che la esprime la capacità di resistere agli attacchi dei lepidotteri patogeni e dannosi (Report EPA, 2010; EFSA Journal, 2013).

Materiali e metodi

Campioni oggetto di studio e preparazione

Oggetto della sperimentazione sono stati 18 campioni di granella di mais, il cui peso di partenza era circa 1200 grammi, corrispondente a circa 3000 semi (GU n°281/2003), pervenuti in Istituto nel 2013 e nel 2014.

Tali campioni sono stati interamente macinati con Grindomix (GM200, Retsch GmbH, Haan, Germany,) ed opportunamente miscelati per renderli omogenei. Per l’analisi del DNA l’aliquota da saggio corrisponde a un peso di $2 \text{ gr} \pm 0.2 \text{ gr}$, mentre per l’analisi proteica sono necessari 50 gr.

Estrazione del DNA: il DNA è stato estratto in doppio mediante metodica CTAB (ISO 21571:2005), risospeso in 200 μL di acqua demineralizzata sterile, purificato tramite QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) secondo il manuale del produttore, tranne per la fase di eluizione finale avvenuta in 150 μL di Buffer AE.

Dosaggio del DNA: il DNA estratto è stato quantificato al fotometro (Eppendorf®, Hamburg, Germany), (ISO 21571:2005).

Fast PCR real-time

L’iter analitico del DNA estratto prevede fasi sequenziali di PCR real time, che da alcuni anni il laboratorio esegue in modalità *Fast*. La prima verifica riguarda la presenza del gene endogeno pianta-specifico e l’amplificabilità del DNA mediante Fast Monitor Run. La seconda fase consiste in un multi-screening di 6 elementi genici, caratteristici della maggior parte dei costrutti transgenici. Il terzo *step* è la tipizzazione dell’evento OGM, individuato mediante la combinazione degli elementi genici rilevati nella fase precedente. L’ultimo *step* prevede la quantificazione del transgene rilevato in fase di tipizzazione (Fast PCR real-time quantitativa, o FQ-PCR).

Le suddette prove sono state eseguite mediante piattaforma 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, USA), con il seguente profilo termico: 95°C 20" x 1 ciclo [95°C 1",60°C 20"] x 40 cicli.

Le PCR sono state condotte in un volume finale di 20 µL utilizzando TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Foster City, USA) alla concentrazione finale di 1X, 900 nM dei primer forward e reverse, 250 nM di probe (Tabella 1) e 2 µl di DNA genomico estratto, testato in doppio per le analisi qualitative e in triplo per le analisi quantitative.

Fast Monitor Run (FMR): il gene endogeno per la rilevazione di mais (*Zea mays*) è il gene codificante per l'Alcohol Dehydrogenase 1 (ADH1) (ISO 21570:2013). La verifica per l'assenza di inibitori è ottenuta testando il DNA estratto tal quale e la sua diluizione 1:4.

Fast Multi-screening (FM-S) e Tipizzazione (FT): i DNA estratti sono stati testati per i seguenti elementi genetici: promotore 35S (P35S) del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV) (UNI EN ISO 21570:2013); terminatore NOS (T-NOS) del gene nopalina sintasi di *Agrobacterium tumefaciens* (metodo interno); gene CP4-EPSPS, derivato dal ceppo CP4 di *Agrobacterium tumefaciens* (Vaitilingom M., *et al* 1999); costruito CTP2-CP4-EPSPS, derivato dalla giunzione della sequenza codificante per il peptide segnale CTP (*chloroplast transit peptide*) derivato da *Arabidopsis thaliana* e la sequenza EPSPS derivata dal ceppo CP4 di *Agrobacterium tumefaciens* (EUR24526EN, 2011); gene NPTII, derivato da *Escherichia coli* (Cheng X.Y. *et al.*, 2008); gene PAT, derivato da *Streptomyces viridochromogenes* (Weighardt F. *et al.*, 2004). La tipizzazione è stata eseguita per l'evento di mais GM MON810 (EUR24526EN, 2011).

Quantificazione (FQ): per quantificare la presenza dell'evento MON810 è stata eseguita una quantificazione relativa, in cui la percentuale di OGM viene valutata, mettendo in relazione la quantità di MON810 con quella del gene endogeno, ADH1. La curva di calibrazione è costituita da materiale di riferimento certificato (CRM) MON810 a cinque percentuali crescenti di OGM (0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 5% MON810, acquistati da IRMM, Geel, Belgium).

a)

nome	sequenza oligonucleotidi 5'- 3'	amplificato bp	riferimento
sequenza del gene ALCOHOL DEHYDROGENASE 1			
ADH-FF3	CGT CGT TTC CCA TCT CTT CCT CC	134	UNI EN ISO 21570:2013
ADH-RR4	CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC		
ADH1-MDO	FAM-AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA-TAMRA		

b)

nome	sequenza oligonucleotidi 5'- 3'	amplificato bp	riferimento
Promotore 35S			
35S-F	GCC TCT GCC GAC AGT GGT	82	UNI EN ISO 21570:2013
35S-R	AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C		
35S-TMP	FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC G-TAMRA		
Terminatore NOS			
NOS-5F	GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT GAG A	105	metodo interno
NOS-7R	TTA TCC TAG TTT GCG CGC TAT ATT T		
NOS-P	FAM-TGC GGG ACT CTA ATC ATA AAA ACC CA-TAMRA		
Gene NPTII			
NPTII-F	GAT AGC GGT CCG CCA CAC	113	Cheng X.Y. <i>et al.</i> , 2008
NPTII-R	CGA GGA TCT CGT CGT GAC ACA T		
NPTII-Pro	FAM-TTT CCA CCA TGA TAT TCG GCA AGC AGG-TAMRA		
Gene PAT			
PAT-KVM5	TTG AGG GTG TTG TGG CTG GTA	68	Weighardt F. <i>et al.</i> , 2004
PAT-KVM6	TGT CCA ATC GTA AGC GTT CCT		
Pat1-P	FAM-CTT CCA GGG CCC AGC GTA AGC A-TAMRA		
Gene CP4-EPSPS			
Sttmf3a-F	GCA AAT CCT CTG GCC TTT CC	146	Vaitilingom M. <i>et al.</i> , 1999
Sttmr2a-R	CTT GCC CGT ATT GAT GAC GTC		
Sttmpa-P	FAM-TTC ATG TTC GGC GGT CTC GCG-TAMRA		
Costrutto CTP2-CP4EPSPS			
GT73-TmF	GGG ATG ACG TTA ATT GGC TCT G	88	EUR24526EN, 2011
GT73-TmR	GGC TGC TTG CAC CGT GAA G		
GT73-TM	FAM-CAC GCC GTG GAA ACA GAA GAC ATG ACC-TAMRA		

c)

nome	sequenza oligonucleotidi 5'- 3'	amplificato bp	riferimento
mais GM MON810			
MAIL-F1	TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CGT	92	UNI EN ISO 21570:2013
MAIL-R1	GCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT		
MAIL-S2	FAM- AAC ATC CTT TGC CAT TGC CCA GC -TAMRA		

Tabella 1. Sequenze primer forward, primer reverse e probe: a) gene endogeno ADH1; b) elementi di screening P35S, T-NOS, CP4-EPSPS; CTP2-CP4EPSPS, PAT, NPTII; c) evento transgenico MON810.

Lateral Flow Test (LFT)

Lo strumento utilizzato nella sperimentazione per la rilevazione e la quantificazione della proteina Cry1Ab è il Quicksan (Envirologix, Portland, USA), mediante l'impiego di Quickstrix strip (Quickstrix Kit for Quicksan – Cry1Ab Corn Bulk Grain, Envirologix).

All'aliquota da saggio è stata aggiunta acqua demineralizzata sterile in un rapporto da 1,5 a 1 (75 ml). Il campione è stato vortexato per 30 secondi, miscelato accuratamente, fatto stabilizzare a temperatura ambiente almeno per 30 secondi e trasferito in una provetta sterile da 50 ml; dopodiché, essendo una matrice non completamente liquida, la provetta è stata centrifugata a 5000 rpm per circa 2-3 minuti. Il surnatante di 20 ml è stato trasferito in un bicchierino fornito dal kit, in cui è stata poi immersa la QuickStix Strip: essa è stata lasciata reagire per 5 minuti, prima di visualizzare le bande e di sottoporla all'interpretazione mediante Quicksan e software dedicato.

Risultati

Analisi del DNA genomico

La concentrazione dei DNA estratti è risultata essere intorno ai 40 ng/μl, tutti hanno mostrato amplificazione per il gene endogeno ADH1, con un ΔCt di circa 2, indice di purezza. Il ΔCt si ottiene dalla differenza del Ct medio del DNA genomico e il suo diluito 1:4 con un range di accettabilità tra 1,5 e 2,5 Ct.

Tutti i DNA sono stati testati in multi-screening, di questi 10 sono risultati positivi solo per l'elemento genetico P35S, mentre 8 (ID 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) sono risultati negativi a tutti i target di screening (tabella 2). I campioni positivi al promotore 35S sono stati poi analizzati per la tipizzazione dell'evento MON810 (tabella 3), risultando positivi al transgene (tabella 2). Infine, in fase quantitativa, quattro campioni sono risultati inferiori al limite di quantificazione della metodica (LOQ), corrispondente a 20 copie genomiche (c.g.) (tabella 3); sotto tale limite non viene assicurata la ripetibilità del dato, ma viene comunque fornito un risultato in percentuale, utilizzabile, in questo contesto, per il confronto con il contenuto della proteina Cry1Ab. In particolare, il campione 2 corrisponde a una percentuale di OGM di 0,30%, il numero 3 a 0,15%, il campione 8 a 0,05%, infine il numero 10 a 0,04% (tabella 2). Sei campioni (ID 1, 4-7, 18) sono risultati invece superiori al 5%, ovvero alla concentrazione e punto più alto della curva di calibrazione, pertanto, uscendo dal *range* dinamico, la percentuale è approssimativa. I campioni 1, 4, 6, 7 corrispondono a

una percentuale di OGM di circa il 100%, il campione 5 a circa il 10% e infine il numero 18 risulta pari a 5,4% (tabella 2).

ID campione	Anno analisi	MON810	
		DNA (%)	Cry1Ab (%)
1	2013	> 5% (100%)	> 5%
2		< LOQ 20 c.g. (0,30%)	1%
3		< LOQ 20 c.g. (0,15%)	1,70%
4		> 5% (100%)	> 5%
5		> 5% (10%)	> 5%
6		> 5% (100%)	> 5%
7		> 5% (100%)	> 5%
8		< LOQ 20 c.g. (0,05%)	1,70%
9		non rilevato	< LOD
10		< LOQ 20 c.g. (0,04%)	2,90%
11		non rilevato	< LOD
12		non rilevato	< LOD
13	2014	non rilevato	< LOD
14		non rilevato	< LOD
15		non rilevato	< LOD
16		non rilevato	< LOD
17		non rilevato	< LOD
18		> 5% (5,4%)	> 5%

LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; c.g.: copie genomiche

Tabella 2. Risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di granella di mais mediante Fast Real-time PCR (DNA %) e Quicksan (Cry1Ab %)

FMR		FAST Multi-Screening						FT		FQ	
gene endogeno	LOD (c.g.)	specie vegetale	elementi genetici di screening					eventi GM	LOD (c.g.)	LOQ (c.g.)	
			P35S	T-NOS	CP4-EPSPS	CTP2-CP4EPSPS	PAT				NPTII
		LOD (c.g.)	10	10	10	10	10	10			
ADH1	10	mais	+	-	-	-	-	-	MON810	10	20
			+	-	-	-	-	-	Bt176	5	10
			-	+	-	-	-	-	GA21	10	20
			-	+	-	-	-	-	MIR604	10	20
			+	-	-	-	+	-	T25	5	20
			+	-	-	-	+	-	DAS1507	10	20
			+	-	-	-	+	-	DAS59122	10	20
			+	+	-	-	+	-	Bt11	10	20
			+	+	-	-	-	+	MON863	10	20
			+	+	+	+	-	-	NK603	10	20

Tabella 3: iter analitico dei DNA estratti, limiti di determinazione (LOD) e limiti di quantificazione (LOQ) di ciascun target espressi in numero di copie genomiche (c.g.)

Analisi della proteina Cry1Ab

Parallelamente, lo strumento Quicksan ha permesso di analizzare nei 18 campioni di granella di mais la quantità di proteina transgenica Cry1Ab contenuta, che ha reagito con l'anticorpo specifico in 10 campioni (ID 1-8, 10 e 18); in tal caso si sono osservate due bande di colore rossastro, di cui una rappresenta la banda di controllo dello strumento, sempre presente, in quanto riconosce una proteina antigenica costitutiva della matrice, l'altra la banda del test: tanto maggiore è il contenuto di OGM tanto più quest'ultima si colora.

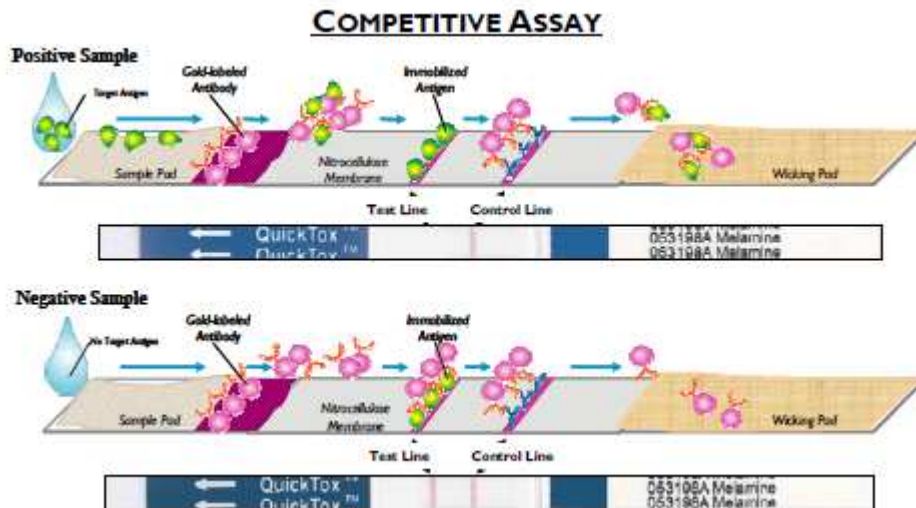


Figura 1. Lateral Flow test: principio di funzionamento

La quantificazione si basa sul rapporto tra le intensità delle due bande ed è normalizzata garantendo la massima riproducibilità e ripetibilità senza bisogno di referenze esterne (www.generon.it). Acquisendo le immagini mediante Quicksan è stato possibile ottenere i seguenti valori numerici, corrispondenti alla quantità di proteina rilevata: in particolare per i campioni 1, 4-7 e 18 si è ottenuta una concentrazione maggiore del 5%, per il campione 2 una concentrazione pari all'1%, per il campione 3 e 8 una quantità corrispondente a 1,70%, infine il campione 10 è risultato essere concentrato a 2,90% (Figura 2).

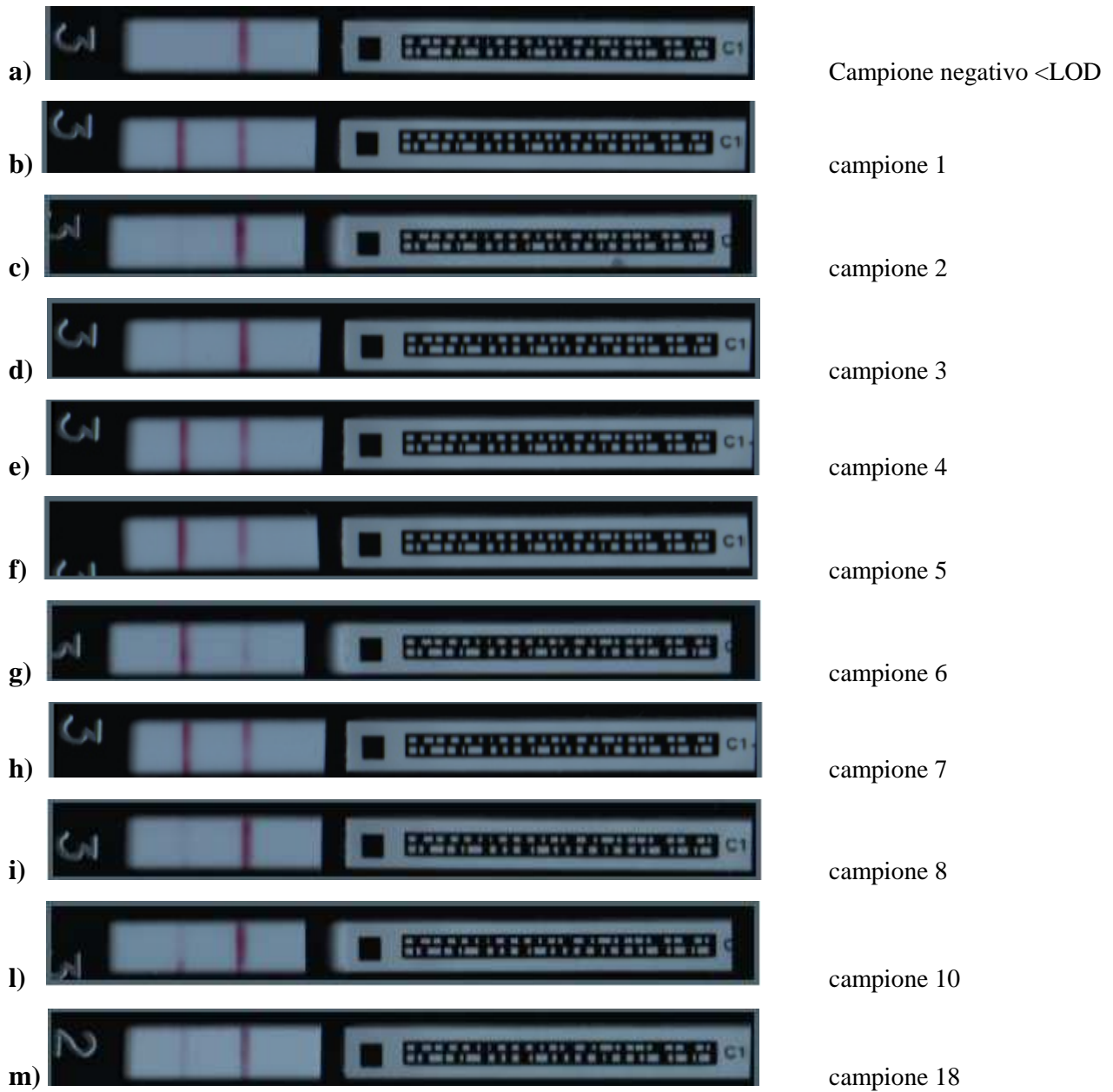


Figura 2. a) quickstix strip di un esempio di campione negativo <LOD, contenente solo la banda di controllo; **b-m)** quickstix strips dei 10 campioni positivi, contenenti sia la banda di controllo sia la banda relativa alla proteina Cry1Ab, di diversa intensità in base alla concentrazione.

Discussione e conclusioni

E' stato possibile comparare i dati relativi all'analisi quali/quantitativa del DNA a quelli relativi all'analisi rapida quali/quantitativa della proteina Cry1Ab espressa, come constatabile dalla tabella 2.

Dall'analisi qualitativa si ha una totale concordanza dei risultati, in quanto i campioni negativi e quelli positivi risultano tali da entrambe le metodiche. Laddove l'evento MON810 non è stato rilevato, parallelamente anche la banda Cry1Ab è risultata assente, dovuta alla mancata rilevazione della proteina stessa, risultato espresso come < LOD (Tabella 2).

Dall'analisi quantitativa, invece, è emersa sovrapposibilità e concordanza per quel che riguarda i punti di massima quantificazione, mentre un certo scostamento è stato rilevato per i valori intermedi o meglio per i valori che in FQ-PCR sono molto bassi e inferiori al LOQ di 20 c.g..

Infatti, laddove in FQ-PCR, l'evento MON810 è stato quantificato come superiore al 5% anche la proteina è risultata essere superiore al 5% (Tabella 2).

Nei casi in cui il mais GM MON810 è stato quantificato in FQ-PCR come inferiore al LOQ (Tabella 3), con valori nell'ordine dello 0,30%, 0,15%, 0,05%, 0,04%, lo strumento Quicksan ha rilevato, parallelamente, una maggiore concentrazione di proteina espressa, con valori pari a 1%, 1,7%, 1,7%, 2.9% (Tabella 2). Questo è dovuto al fatto che, mentre il DNA è presente in egual misura in tutto il genoma della pianta, la proteina cambia livello di espressione sia nelle fasi di crescita che nei vari tessuti.

Inoltre, come è ben noto dalla biologia cellulare e molecolare, la trascrizione genica del DNA in RNA può essere potenziata sia dall'uso di promotori forti nella fase di assemblaggio della cassetta transgenica sia dai cosiddetti *enhancer*, sequenze geniche poste a monte o a valle del promotore e che fungono appunto da intensificatori del processo cellulare. Nel caso dell'evento transgenico MON810 si ha la presenza di P35S, che, essendo un promotore forte, dovrebbe contribuire a potenziare la trascrizione del DNA in mRNA, aumentando l'espressione genica e di conseguenza la sintesi proteica.

Quindi in assenza di DNA transgenico non verrà rilevata nemmeno la proteina, mentre una maggiore percentuale rilevata con l'immunosaggio non corrisponde necessariamente ad un campione non conforme a quanto previsto dalle normative in vigore (Regolamenti CE 1829/2003, CE 1830/2003, UE 619/2011).

Da questo esperimento e da questa verifica è emerso che per materie prime non processate, come nel caso specifico granella di mais, qualora si fosse interessati ad identificare la presenza della proteina Cry1Ab, è possibile adottare la metodica Quicksan: essa è infatti pratica e veloce, utilizzabile anche da personale non altamente qualificato, molto utile per verifiche in campo, soprattutto in fase di semina e/o raccolta ed eventualmente utilizzabile in laboratorio per uno screening rapido dei campioni, da sottoporre comunque a verifica in real-time PCR, che rimane, ad

oggi, l'unica tecnica che risponde pienamente alla legislazione vigente e che è applicabile anche su matrici processate.

Bibliografia

Bio-pesticides registration action document: Cry1Ab and CrY1F. *Bacillus thuringiensis* (Bt) Corn Plant-incorporated Protectans. U.S Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs Biopesticides and Pollution Prevention Division; Report EPA; September 2010. <http://www.generon.it>.

Cheng X. Y., Jun Z., Ka M. C., Xiao K. L., Yan H. (2008). Quantitative real-time PCR assay to detect transgene copy number in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Analytical Biochemistry*, Volume 375, Issue 1, 1 April, Pages150-152.

EFSA Journal; Scientific Opinion on a request from the European Commission related to the emergency measure notified by Italy on genetically modified maize MON 810 according to Article 34 of Regulation (EC) No 1829/2003 EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)2, 3 European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, 2013; 11(9):3371

EUR24526EN; JRC Reference Reports - Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, 2011
Gazzetta Ufficiale n°281, 3-12-2003. Decreto 27 novembre 2003 “Campagna di semina – Modalità di controllo delle sementi di mais e soia per la presenza di organismi geneticamente modificati”.

ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-Biotech applications
<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>, 2014

ISO 21571:2005 “Foodstuff - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction”.

Regolamento (CE) N. 1829/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati; Gazzetta Ufficiale, 18.10.2003, L 268/1

Regolamento (CE) N. 1830/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 concernente la tracciabilità e l'etichettatura di organismi geneticamente modificati e la tracciabilità di alimenti e mangimi ottenuti da organismi geneticamente modificati, nonché recante modifica della direttiva 2001/18/CE; Gazzetta Ufficiale, 18.10.2003, L 268/24

Regolamento (UE) N. 619/2011 della Commissione del 24 giugno 2011 che fissa i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per animali riguardo la presenza di materiali geneticamente modificato per il quale sia in corso una procedura di autorizzazione o la cui autorizzazione sia scaduta.

UNI EN ISO 21570:2013 Foodstuff-Methods of analysis for the detection of genetically modified organism and derived product. Quantitative nucleic acid based methods.

Vaitilingom M., Pijnenburg H., Gendre F and Brignon P. “Real-time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Maximizer Maize and Roundup Ready Soybean in Some Representative Foods” *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47 (12), pp 5261-5266.

Weighardt F., Barbati C., Paoletti C., Querci M., Kay S., De Beuckeleer M. and Van den Eede G.: “Real-Time Polymerase Chain Reaction-Based Approach for Quantification of the pat Gene in the T25 Zea mays Event” Journal of AOAC International (2004), 87 (6): 1342-1355.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy	
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047	
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it	
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it ; redazione-spvet@izsum.it http://spvet.it ; http://indice.spvet.it	
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it	