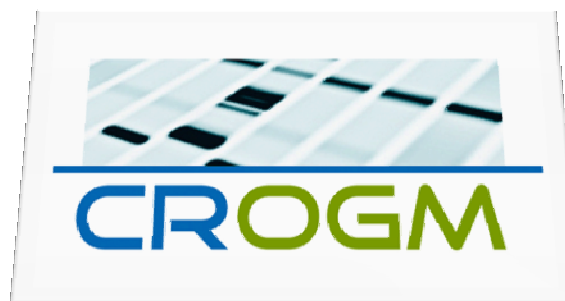


Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e  
Toscana

# 6° WORKSHOP DEI LABORATORI DEL CONTROLLO UFFICIALE DI OGM

Roma 19-20 maggio 2014

Annalisa  
Paternò



**Centro di Riferenza Nazionale per la ricerca di OGM**



# Ricerche in corso

- **Ricerca finalizzata 2009** “Development of guidelines, management systems and new methodology for GMOs traceability, own-checks procedures and official control in the food and feed supply chain with respect to EU legal requirements”
- **Ricerca corrente 2011 (izslt 14/11)** “Caratterizzazione varietale di frumento (*triticum aestivum*) di interesse alimentare per l’individuazione di un gene endogeno di riferimento per la ricerca di OGM e per la valutazione dell’attività della liposiigenasi in relazione alla presenza di micotossine



# Ricerca corrente 2011

## Work-package 1 – Obiettivi:

Valutazione dell'attività lipossigenasica, dei livelli di espressione dell'enzima e del contenuto in metallo nel sito attivo, da estratti grezzi e isolati proteici ottenuti da semi di grano di diverse cultivar;

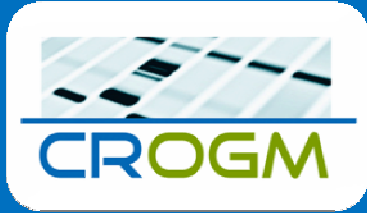
Caratterizzazione dell'attività lipossigenasica in partite di semi caratterizzate per quanto attiene la contaminazione fungina e la presenza di micotossine.

## Work-package 2 – Obiettivi:

Individuazione di target molecolari specifici che si dimostrino conservati nelle diverse cultivar di frumento, e risultino stabili in termini di sequenza nucleotidica e numero di copie

Sviluppo e validazione di un metodo PCR real time sul gene di riferimento individuato per l'identificazione e quantificazione della specie frumento (*Triticum aestivum*)





# Ricerca corrente 2011

- Il CRA(Consiglio per la Sperimentazione in Agricoltura-exENSE) ha fornito un totale di 20 varietà di frumento italiane
- Alle unità operative coinvolte sono state spedite le prime 10 varietà

## Work-package 1

- Analisi micologiche colturali
- Analisi HPLC per il rilevamento di micotossine
- Sviluppo di un protocollo di purificazione della lipossigenasi dall'estratto proteico di farina di grano tenero



# Ricerca corrente 2011

Work-package 2

Grano tenero (*Triticum aestivum*) transgenico

-MON 71800:emergenza frumento importato dagli USA

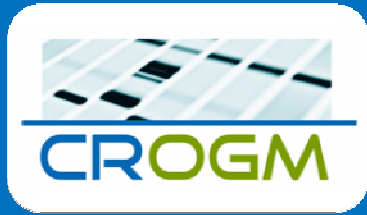
Nota dell'EURL sui geni endogeni "Literature and bioinformatics analysis of wheat specific detection method"

Lavori consigliati:

-Matsuoka et al 2012

-Iida et al 2005





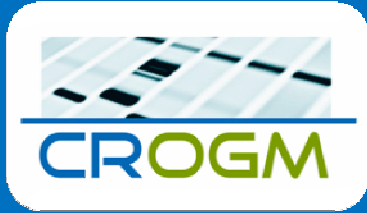
# Ricerca corrente 2011

Work-package 2

## Geni endogeni

- waxy-D1 (da Iida et al 2005)
  - ssII-D (da Matsuoka et al 2012)
- } Coinvolti nella sintesi dell'amido





# Ricerca corrente 2011

Work-package 2

## Confronto tra waxy-D1 e ssl-D

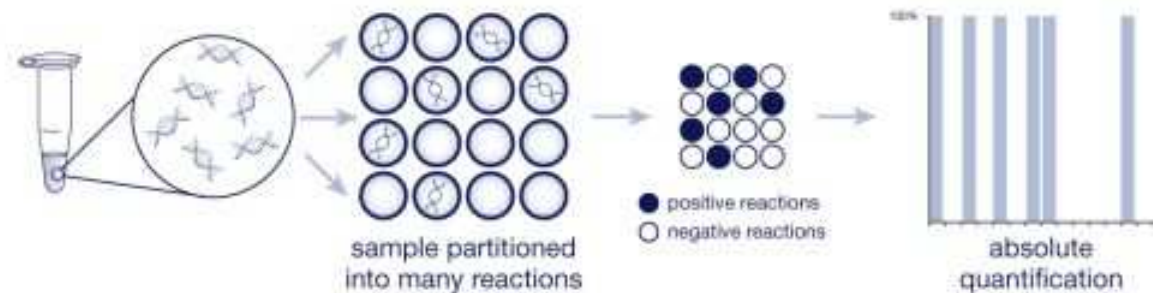
Determinazione del limite di rilevabilità (LOD) per i due sistemi

Analisi in PCR digitale

- ottimizzazione protocollo
- pool di DNA di 10 varietà italiane di grano tenero
- 5 diluizioni seriali



# PCR digitale



Quantificazione assoluta del numero di acidi nucleici, presenti nel campione, senza la necessità di curve di calibrazione (necessarie nella real-time PCR)



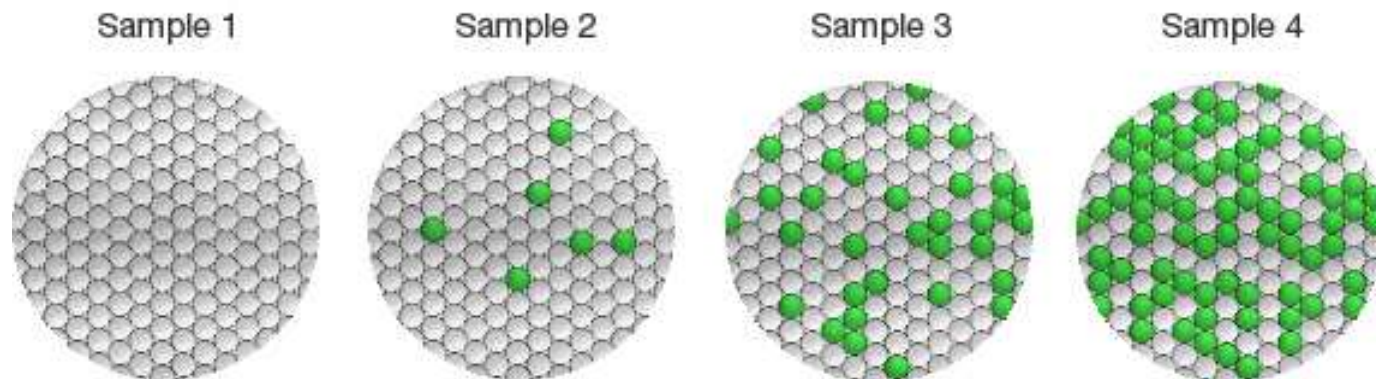
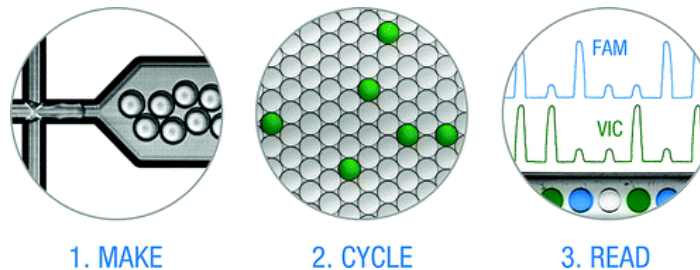


# droplet digital PCR

## Droplet digital PCR

Tre sono gli step fondamentali per l'esecuzione della ddPCR :

- trasformazione e ripartizione del campione in migliaia di gocce
- amplificazione dell'emulsione
- lettura e analisi attraverso la statistica di Poisson





# Ricerca corrente 2011

Work-package 2

## Confronto tra waxy-D1 e ssl-D

Determinazione del limite di rilevabilità (LOD) per i due sistemi

Analisi in PCR digitale

- ottimizzazione protocollo
- pool di DNA di 10 varietà italiane di grano tenero
- 5 diluizioni seriali



# droplet digital PCR





# Ricerca finalizzata 2009

**Work-package 1 – Tracciabilità e autocontrollo**

**Work-package 2 – Controllo ufficiale**





# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 1: Tracciabilità ed autocontrollo

- 1.1 individuazione di un modello di filiera di produzione mangimistica che impiega OGM
- 1.2 studio approfondito di un processo tipico di produzione mangimistica prendendo in considerazione fattori d'ingresso (ad es materie prime requisiti di formazione e competenza), parametri di produzione (ad es attrezzature e procedure)
- 1.3 identificazione di punti critici di controllo nella filiera produttiva mangimistica rispetto ai requisiti di tracciabilità ed etichettatura
- 1.4 definizione di requisiti da soddisfare per la segregazione della filiera OGM da quella non OGM e per la riduzione del rischio di contaminazione di impurità botaniche

[...]





# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 1: Tracciabilità ed autocontrollo

Tipologia aziendale: **Mangimificio Costamagna**

- linea di produzione unica
- produzione di mangimi completi e complementari non-OGM per bovini da carne, prodotti su ordinazione in un unico giorno di lavorazione previa pulizia della parte d'impianto utilizzata
- stoccaggio delle materie prime non-OGM in silos dedicati
- trasporti dedicati

Definizione di una check list d'impianto (Reg(CE)183/2005) con aspetti rilevanti per il controllo degli OGM



# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

1.

[...]

2.2 studio della praticabilità delle procedure di campionamento riportate nella Raccomandazione CE 787/2004, anche a confronto con il Reg152/2009 CE

2.2.1 campionamento sperimentale mediante procedura dinamica e statica

2.2.2 identificazione dei punti critici della procedura di campionamento in termini di praticabilità e sicurezza





# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

Valutazione della cross contaminazione e inquinamento lungo la linea di produzione: installazione di tre autocampionatori in punti critici (precedentemente valutati)

Campionamento in modalità manuale ed automatica

Analisi in laboratorio dei campioni prelevati





# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

## Work-package 2 – Controllo ufficiale

2.3 Sviluppo di procedure analitiche finalizzate ad ottimizzare l'efficienza e l'efficacia del controllo analitico in termini di numero di specie vegetali analizzate, numero di eventi GM rilevati e quantificati, riduzione di costi e tempi di esecuzione di analisi

2.3.1. identificazione di possibili strategie volte al miglioramento dell'efficienza e dell'efficacia del controllo analitico

2.3.2. sviluppo e/o validazione intralaboratorio di procedure analitiche

2.3.3. prevalidazione di procedure analitiche con un numero limitato di laboratori

2.3.4. piena validazione di procedure analitiche con la rete italiana dei laboratori OGM



# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

## **Ipotesi di lavoro1: determinazione del valore cut off**

### **Fase 1**

- ☐ Selezione di metodi PCR real time es: 35S
- ☐ Trasferimento del metodo in PCR digitale per la quantificazione assoluta
- ☐ Allestimento di n diluizioni da 50 a 0,1 copie genomiche teoriche
- ☐ Esecuzione in parallelo di real time PCR e PCR digitale sui suddetti n livelli di concentrazione
- ☐ Individuazione livello LOD secondo quanto definito nella PGVIR007
- ☐ Calcolo media e scarto tipo per valori di Ct ottenuti in real time e n.copie ottenuto in digitale
- ☐ Costruzione retta di regressione lineare correlando i valori di Ct ottenuti in real time (ordinate) con i corrispondenti log n. copie calcolate in PCR digitale
- ☐ Valutazione statistica del tipo di distribuzione dei valori di Ct ottenuti su tutti i livelli di concentrazione



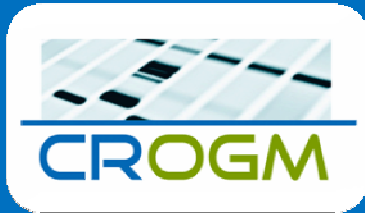
# Dati nazionali 2013 alimentazione umana e animale: campioni positivi al 35S

n.campioni tot.	n.campioni testati per 35S	n.campioni pos. 35S
1607	1382	289



20 campioni non regolamentari (la maggior parte delle non conformità si riscontrano nell'alimentazione animale)

*Fonte database CROGM*



# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

## **Determinazione del valore cut off per il promotore 35S**

- ☐ Allestimento diluizioni: da 280 a 4 copie genomiche (teoriche) per un totale di 7 diluizioni
- ☐ Analisi in real time e in digitale (nella stessa giornata)
- ☐ ddPCR: 7 replicati per ciascuna diluizione  
real time: 6 replicati per ciascuna diluizione
- ☐ 3 prove su 3 estratti di mais MON810 1%  
3 prove su 3 estratti di soia RR1%



# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

## Determinazione del valore cut off per il promotore 35S

274	136	64	34	17	9	4
30,93	32,01	32,62	33,75	35,64	36,25	Undetermin
30,99	31,75	32,94	34,65	35,28	36,31	36,75
30,92	31,84	33,48	33,80	34,94	36,18	36,32
30,92	32,25	33,11	34,20	35,06	36,42	37,59
30,90	31,95	33,06	33,78	34,39	36,60	36,31
30,86	32,03	33,15	33,97	34,38	36,44	37,26
30,92	31,97	33,06	34,03	34,95	36,37	--
258	129	63	31	14	9	2
29,84	30,71	32,48	34,02	34,66	35,21	37,36
29,85	30,85	31,63	33,04	34,69	35,55	36,73
29,72	30,90	32,06	33,06	34,24	35,99	36,05
29,86	31,12	32,29	33,12	34,29	37,18	36,39
30,13	30,96	31,85	33,27	34,42	34,67	37,23
29,71	31,56	32,28	33,30	34,57	36,21	36,91
29,85	31,02	32,10	33,30	34,48	35,80	36,78
176	93	42	25	8	7	4
31,43	32,25	33,28	35,05	35,27	36,13	37,27
31,36	32,67	33,55	33,82	35,30	36,35	38,77
31,60	32,34	32,95	34,21	36,04	37,65	38,49
31,43	32,54	33,66	34,43	35,37	36,82	38,55
31,33	32,42	33,77	34,87	35,32	36,69	37,62
31,64	32,05	33,33	34,73	35,43	37,55	37,96
31,47	32,38	33,42	34,52	35,46	36,87	38,11

MAIS MON810 1%

$Ct(LOD)+2\sigma = Ct(\text{cut off})$

$36,34+ 2*(0,74)= 37,82$



# Ricerca finalizzata 2009

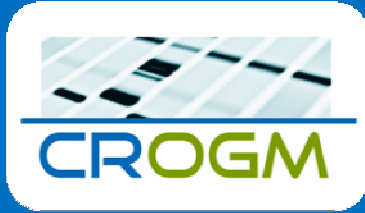
Work-package 2- Controllo ufficiale

126	57	26	14	7	4	-
32.53	33.86	34.46	35.52	36.47	37.53	38.69
32.27	33.55	34.53	35.48	35.97	38.21	38.58
32.45	33.84	34.38	35.58	37.33	38.93	40.10
32.18	33.45	34.42	35.34	37.78	37.53	Undetermined
32.30	33.63	34.25	35.28	37.07	36.96	38.63
32.51	33.77	34.43	37.11	36.52	38.90	37.90
<b>32.37</b>	<b>33.68</b>	<b>34.41</b>	<b>35.72</b>	<b>36.86</b>	<b>38.01</b>	---
39	19	11	6	-	-	-
34.47	34.72	35.98	36.46	39.51	39.32	39.39811
33.80	35.28	35.79	37.00	40.15	37.64	38.59692
33.72	34.66	36.44	36.26	37.73	38.32	Undetermined
33.72	35.11	36.12	38.73	39.81	Undetermined	41.22966
33.77	35.46	35.60	36.65	38.07	38.38	39.424
34.08	35.46	35.87	37.70	Undetermined	39.50	38.15775
<b>33.93</b>	<b>35.11</b>	<b>35.97</b>	<b>37.13</b>	---	---	---
71	33	16	7	4	2	-
32.82	33.90	34.94	35.83	36.98	38.78	40.01819
33.16	33.95	34.75	36.25	36.37	38.79	Undetermined
32.45	34.40	35.43	35.68	36.77	38.57	37.6427
32.92	33.90	34.84	36.06	36.83	37.01	Undetermined
32.81	33.35	35.17	35.72	37.52	37.65	39.99855
32.87	34.20	34.60	36.91	36.88	38.27	40.34118
<b>32.84</b>	<b>33.95</b>	<b>34.95</b>	<b>36.07</b>	<b>36.89</b>	<b>38.18</b>	---

SOIA RR 1%

$Ct(LOD)+2\sigma = Ct(\text{cut off})$

$36,69+ 2*(0,81)= 38,31$



# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

Analisi dei dati complessiva

$$Ct(LOD)+2\sigma = Ct(\text{cut off})$$

$$36,52+ 2(0,78)= 38,1$$



# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

2.4 sviluppo di sistemi di accreditamento di laboratorio con campo di accreditamento flessibile da attuarsi nell'ambito del controllo analitico di alimenti e mangimi





# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

2.5 sviluppo di modelli predittivi da utilizzarsi per la definizione e l'attuazione di piani di monitoraggio e di sorveglianza

2.5.1 studio delle fonti informative disponibili (qualitative/quantitative) riguardanti materie prime importate in Italia: volume annuo di importazione per ciascun prodotto; paese d'origine; destinazione geografica; destinazione d'uso finale

2.5.2 raccolta di informazioni sulla produzione nazionale (descrizione e quantificazione dei prodotti finiti a partire dalle specie vegetali importate)



# Ricerca finalizzata 2009

Work-package 2- Controllo ufficiale

- Attività svolta in collaborazione con l'Osservatorio epidemiologico
- Definizione delle matrici inerenti all'analisi OGM identificate con codici TARIC
- Identificazione delle fonti : FAO e Ministero della Salute



**GRAZIE**