

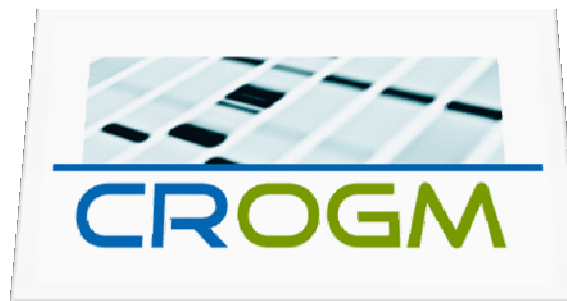
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni  
Lazio e Toscana

**L'esperienza del CROGM nell'accreditamento in campo  
flessibile e verifica di metodi**

**DANIELA  
VERGINELLI**

6° Workshop  
dei laboratori del controllo  
ufficiale di OGM

19-20 Maggio 2014



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



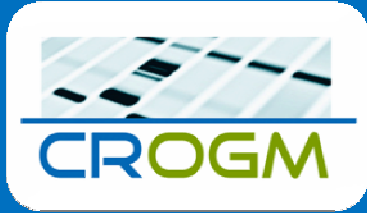
# Argomenti trattati

- ✓ Accreditamento (ISO/IEC 17025)
- ✓ Schema di accreditamento rigido/flessibile
- ✓ Quando applicare lo schema flessibile
- ✓ Esperienza e punti critici nel CROGM
- ✓ Verifica dei metodi presso il CROGM



# Accreditamento e ISO/IEC 17025

- ✓ Un laboratorio che intenda dimostrare di essere tecnicamente competente e di fornire risultati affidabili ed accurati deve attuare un sistema qualità
- ✓ La norma che stabilisce i requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura è la ISO/IEC 17025: "accreditamento"
- ✓ Nell'Unione Europea (EU) i laboratori che effettuano il controllo ufficiale su alimenti e mangimi devono essere accreditati secondo la ISO/IEC 17025 (Reg. 882/2004)



# Schema di accreditamento

✓ Cosa si intende per “schema di accreditamento” ?

E' il sistema che il laboratorio adotta per l'applicazione della norma (normalmente risente molto dell'influenza dell'ente di accreditamento)



# Schema rigido

- ✓ descrizione del campo di accreditamento che dettaglia materiale/matrici/prodotti di prova, grandezze da determinare e metodo/i di prova utilizzato/i.
- ✓ Non è permessa nessuna modificazione prima della revisione successiva
- ✓ Adatto a laboratori che lavorano nelle analisi di routine e che utilizzano metodi standard
- ✓ Nei laboratori di prova il campo di accreditamento è costituito dall'elenco delle prove (*in genere un annex al certificato di accreditamento*)
- ✓ in tale elenco sono riportati i materiali/matrici/prodotti di prova, grandezze da determinare e metodi di prova utilizzati.

(RT-26 Rev.02 2012 Prescrizioni per l'accreditamento con campo di accreditamento flessibile)



# Esempio IZSLT



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA - SEDE CENTRALE DI ROMA**

Via Appia Nuova 1411  
00178 Roma RM

Numero di accreditamento: **0201** Sede **A**

Rev. **19** Data: **28 ott 2009**

Scheda N° **3** di **9** PA234AR19.PDF

Organismi geneticamente modificati (OGM): mais evento GA21  
(presenza/assenza)

POS VIR 007 INT rev 3 2009

Organismi geneticamente modificati (OGM): mais evento MON810  
(presenza/assenza)

POS VIR 004 INT rev 4 2009

Organismi geneticamente modificati (OGM): mais evento MON863  
(presenza/assenza)

POS VIR 008 INT rev 2 2009

Organismi geneticamente modificati (OGM): mais evento NK603  
(presenza/assenza)

POS VIR 009 INT rev 2 2009

Organismi geneticamente modificati (OGM): mais evento T25  
(presenza/assenza)

POS VIR 010 INT rev 2 2009



# Schema flessibile

- ✓ Descrizione più generica del campo di accreditamento
- ✓ Il laboratorio può introdurre nuovi metodi o modificare metodi esistenti nel campo di accreditamento
- ✓ Non necessita di verifica ispettiva per ottenere l'accREDITAMENTO della prova
- ✓ Applicabile a laboratori con una forte componente di ricerca e sviluppo



# Esempio IZSLT



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE  
REGIONI LAZIO E TOSCANA - SEDE CENTRALE DI ROMA**

Via Appia Nuova 1411  
00178 Roma RM

Numero di accreditamento: **0201** Sede **A**

Revisione: **34** Data: **09/04/2014**

Scheda **15** di **15**

PA234AR34.pdf

## ELENCO PROVE ACCREDITATE - CON CAMPO FLESSIBILE

### DNA estratto da matrici agro-alimentari

*Denominazione della prova / Campi di prova*

*Metodo di prova*

Organismi geneticamente modificati: screening (PCR real time)

POS VIR 032 INT (vedi nota in legenda)

Organismi geneticamente modificati: tipizzazione (PCR real time)

POS VIR 033 INT (vedi nota in legenda)

### DNA estratto da matrici agro-alimentari contenenti, costituite o derivate da mais

*Denominazione della prova / Campi di prova*

*Metodo di prova*

Organismi geneticamente modificati: quantificazione mais (PCR real time)

POS VIR 040 INT (vedi nota in legenda)

### DNA estratto da matrici agro-alimentari contenenti, costituite o derivate da riso

*Denominazione della prova / Campi di prova*

*Metodo di prova*

Organismi geneticamente modificati: rilevazione riso mediante sistema  
TaqMan (PCR real time)

POS VIR 041 INT (vedi nota in legenda)

### DNA estratto da matrici agro-alimentari contenenti, costituite o derivate da soia

*Denominazione della prova / Campi di prova*

*Metodo di prova*

Organismi geneticamente modificati: quantificazione soia (PCR real time)

POS VIR 061 INT (vedi nota in legenda)

### Matrici agro-alimentari contenenti, costituite o derivate da soia, mais, cotone, colza, barbabietola da zucchero, riso, grano duro, patata

*Denominazione della prova / Campi di prova*

*Metodo di prova*

Organismi geneticamente modificati: rilevazione geni endogeni (PCR real time)

POS VIR 031 INT (vedi nota in legenda)

“Nota: L’elenco  
aggiornato dei metodi  
e dei relativi campi di  
applicazione per il  
campo flessibile è  
ottenibile visitando il  
sito internet del  
Laboratorio”







# ACCREDITAMENTO FISSO O FLESSIBILE?

- ✓ Quando richiesti dalla normativa cogente o dal cliente, i metodi normalizzati od ufficiali devono sempre essere oggetto del campo di accreditamento fisso del laboratorio, ed indicati nei rapporti di prova
- ✓ Schema fisso gravoso in alcuni settori (es. agro-alimentare, medico) a causa della continua immissione di nuovi metodi e/o allerte che comportano una rapida risposta

*(RT-26 Rev.02 2012 Prescrizioni per l'accreditamento con campo di accreditamento flessibile)*



# Dove è permessa la flessibilità?

**ILAC** - the International Laboratory Accreditation Cooperation  
G18:04/2010



Guideline for the Formulation of Scopes of  
Accreditation for Laboratories

ILAC-G18:04/2010

- ✓ Flessibilità nella matrice (analisi nuovi prodotti con la stessa tecnica per la quale il laboratorio è accreditato)
- ✓ Flessibilità nei parametri (nuovi analiti, nuovi OGM)
- ✓ Flessibilità nei metodi (adozioni di nuovi metodi equivalenti a quelli accreditati, o modifica di quelli esistenti)
- ✓ *Flessibilità nella performance del metodo (intervallo di misura, incertezza) **NO ACCREDIA!!***



# Schema flessibile di accreditamento per "prova tipo"

- ✓Viene definito "accredитamento per prova tipo" perché si accredita non una singola prova, ma un insieme di prove dette "*prova tipo*" (dotata di un processo di validazione e verifica)
- ✓Per "*prova tipo*" si definisce un gruppo di prove caratterizzate dall'utilizzo di metodi simili (che includono preparazione del campione, standardizzazione, calibrazione, validazione, addestramento del personale) applicate ad uno specifico settore



# Il laboratorio

- ✓ Il laboratorio può richiedere lo schema flessibile solo per le prove accreditate da almeno due anni
- ✓ Il laboratorio deve dimostrare una maggiore responsabilità nel modo in cui esso opera
- ✓ Il laboratorio deve disporre della competenza tecnica nello svolgimento delle attività
- ✓ Il laboratorio deve dimostrare la capacità di gestire l'intero processo dalla scelta del metodo alla validazione, all'aggiornamento: sistema di gestione consolidato (avere specifiche procedure per la gestione del campo di accreditamento flessibile)
- ✓ Mantenere un elenco aggiornato dei metodi e dei relativi campi di applicazione pubblicato sul sito istituzionale



# Cosa consiglia l'EA?

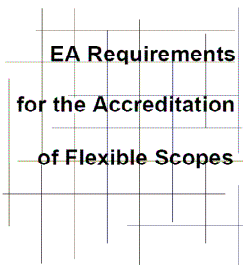
- ✓ L'ente europeo di Accreditamento incoraggia i propri membri all'adozione dello schema flessibile
- ✓ Indica la possibilità di adottare lo schema flessibile in diverse modalità
- ✓ Indica la possibilità di combinare lo schema rigido e quello flessibile
- ✓ Considera la competenza tecnica, e la capacità di gestirla, il cardine dello schema flessibile

EA-2/15 - EA Requirements for the Accreditation of Flexible Schemes

**EA** European  
co-operation for  
Accreditation

Publication  
Reference

EA-2/15



#### PURPOSE

The purpose of this document is to establish overall requirements within EA to enable an accredited CAB to assume responsibility for the management of all or part of its scope of accreditation without the necessity of a preliminary evaluation by the AS for each new activity. EA may supplement these requirements with specific requirements relevant to the particular sector being considered. Where additional requirements are considered necessary, these will be published as separate supplements to this document.

July 08 rev00

1/8

*(EA Requirements for the Accreditation of Flexible Scope, EA-2/15, July 08 2008, date of implementation: 9.7.2009)*





# Come dimostrare la competenza tecnica?

**ILAC** – G18:04/2010 the International Laboratory Accreditation Cooperation

Si può ottenere in vari modi:

- ✓ Conoscenza approfondita da parte degli operatori del laboratorio del campo di applicazione
- ✓ Conoscenza approfondita da parte degli operatori del laboratorio della procedura applicata, inclusa l'incertezza di misura
- ✓ Corsi specifici di formazione per gli operatori e verifica dell'efficacia di tali corsi
- ✓ Cooperazione con organismi internazionali, organismi di standardizzazione internazionale e nazionale
- ✓ Corsi interni di formazione e processi di miglioramento mediante verifiche e revisioni



# Nello schema flessibile è necessario validare i metodi?

- ✓ I nuovi metodi o metodi esistenti modificati devono essere comunque validati
- ✓ Il laboratorio deve avere l'intera documentazione relativa alla validazione ed alla verifica del metodo modificato
- ✓ L'adeguatezza e la robustezza di queste procedure verranno valutate dall'ente di accreditamento

ACCREDITAMENTO FLESSIBILE NON VUOL DIRE NON VALIDARE I METODI



# Negli OGM schema rigido o flessibile?

- ✓ Nell'analisi degli OGM potrebbe essere conveniente l'adozione di uno schema di accreditamento flessibile per vari motivi:
- ✓ Numero sempre maggiore di nuovi OGM sul mercato (autorizzati, in corso di autorizzazione o non autorizzati)
- ✓ Analisi effettuata su un elevato numero di matrici, differenti alimenti, mangimi e semi, diversi target
- ✓ Si adatta bene all'approccio modulare





JRC SCIENTIFIC AND POLICY REPORTS

# European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs

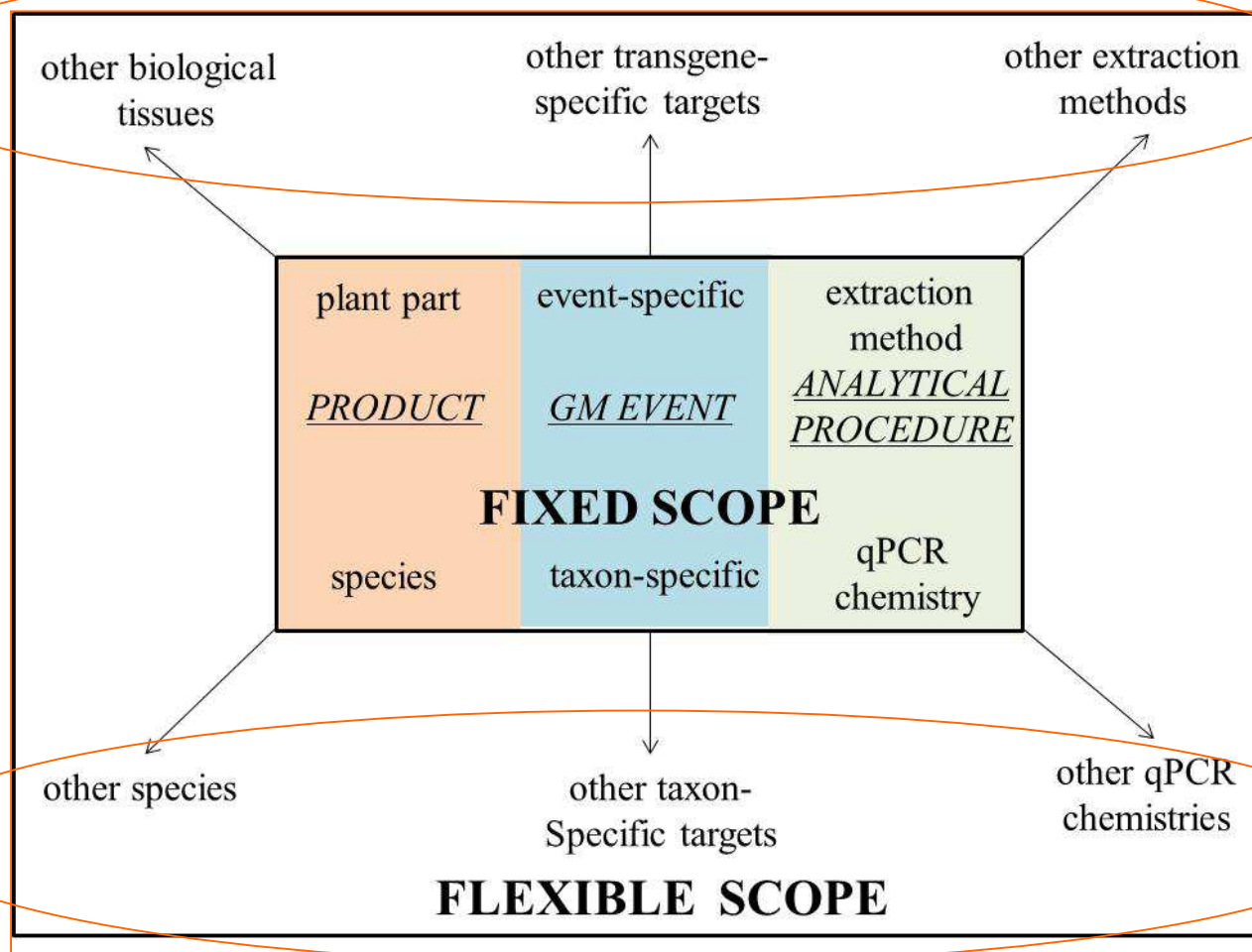
S. Trapmann, C. Charles Delobel, P. Corbisier,  
H. Emons, L. Houghs, P. Philipp, M. Sandberg  
M. Schulze

2013





# *“European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs” JRC*





## *“European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs” JRC*

- ✓ Flessibilità applicata alla matrice (*specie vegetali, prodotti processati, parti della pianta*)
- ✓ Flessibilità applicata all'evento GM (*qPCR con chimica TaqMan validata per Mais GM/specie GM*)
- ✓ Flessibilità applicata alla procedura analitica (*metodi di estrazione del DNA, metodi di quantificazione del DNA mediante qPCR, geni endogeni*)



*“European technical guidance document  
for the flexible scope accreditation of  
laboratories quantifying GMOs” JRC*

ESEMPIO

SCHEMA FISSO

- ✓ Semi di mais per evento MON810
- ✓ Chimica TaqMan per evento MON810/endogeno fisso
- ✓ Estrazione metodo CTAB

SCHEMA FLESSIBILE

- ✓ Semi GM, amido, snack
- ✓ qPCR per OGM/altro gene endogeno
- ✓ Altri metodi di estrazione



# L'accreditamento del CROGM

- ✓ Accreditati dal 2001 con singoli elementi di screening/eventi GM schema fisso
- ✓ Dal 2009 accreditati nelle singole POS più eventi nella stessa specie vegetale ("evento mais DAS1507, evento mais T25...")
- ✓ Dal 2010 accreditati nelle singole POS più eventi nella stessa specie vegetale ("per tipo di prova")
- ✓ Dal 2012 accreditati con schema flessibile solo per prova
- ✓ Dal 2013 in accreditamento con schema flessibile per matrice e per prova



# CROGM: Multimetodo

All'interno dello stesso metodo più prove (accreditamento d'ufficio)

## TIPO DI PROVA

## N° di target

- |   |    |
|---|----|
| 1. PCR specie-specifica                     | 5  |
| 2. PCR di screening                         | 6  |
| 3. TIPIZZAZIONE mais GM                     | 12 |
| 4. TIPIZZAZIONE soia GM                     | 3  |
| 5. TIPIZZAZIONE colza GM                    | 4  |
| 6. TIPIZZAZIONE cotone GM                   | 4  |
| 7. TIPIZZAZIONE barbabietola da zucchero GM | 1  |
| 8. PCR QUANTITATIVA mais GM                 | 12 |
| 9. PCR QUANTITATIVA soia GM                 | 3  |
| 10. PCR QUANTITATIVA colza GM               | 4  |
| 11. PCR QUANTITATIVA cotone GM              | 4  |
| 12. PCR QUANTITATIVA cotone GM              | 4  |

**12 metodi totali**

**60 prove totali**





# Esempio IZSLT

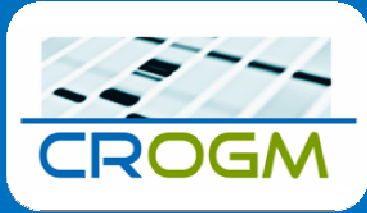
Codice procedura	N. rev.	Data	Metodo	Titolo procedura	Matrice	Matrici campo flessibile	Grandezze campo flessibile	Sedi accreditate
POS VIR 033 INT	2	23/07/12	POS VIR 033 INT rev 2 2012	Organismi geneticamente modificati: tipizzazione mais	DNA estratto da matrici agro-alimentari contenenti, costituite o derivate da mais		Mais evento BT11, evento BT176, evento DAS 1507, evento DAS59122, evento GA21, evento MIR604, evento MON 810, evento MON 863, evento MON89034, evento MON88017, evento NK603, evento T25, evento 3272, evento 98140, evento MIR162, evento LY038, evento DAS591	SEDE DI ROMA (US BIOTECNOLOGIE)
POS VIR 033 INT	3	24/07/13	POS VIR 033 INT rev 3 2013	Organismi geneticamente modificati: tipizzazione (PCR real time)		DNA estratto da matrici agro-alimentari	Mais evento BT11, mais evento BT176, mais evento DAS 1507, mais evento DAS59122, mais evento GA21, mais evento MIR604, mais evento MON 810, mais evento MON 863, mais evento MON89034, mais evento MON88017, mais evento NK603, mais evento T25, mais evento 3272, mais evento 98140, mais evento MIR162, mais evento LY038, mais evento DAS59132-8, mais evento DAS40278-9, soia evento MON40-3-2, soia evento A2704-12, soia evento MON89788, soia evento MON87701, soia evento DP-356043-5, soia evento DP-305423-1, soia evento A5547-127, soia evento CV-127-9, soia evento FG72, cotone evento MON531, cotone evento MON1445, cotone evento MON15985, cotone evento LL25, cotone evento GHB614, cotone evento 281-24-236, cotone evento 3006-210-23, cotone evento GHB119, cotone evento MON88913, cotone evento T304-40, colza evento GT73 (o RT73), colza evento MS8, colza evento RF3, colza evento T45, colza evento MS1, colza evento RF1, colza evento RF2, colza evento TOPAS 19-2, barbabietola da zucchero evento H7-1, patata evento EH92-527-1, lino evento FP967	SEDE DI ROMA (US BIOTECNOLOGIE)



# Punti critici

- ✓ Per poter passare dallo schema rigido a quello flessibile abbiamo dovuto armonizzare i metodi in quanto erano presenti numerose variabilità
- ✓ Procedurare tutti i singoli step del processo di validazione
- ✓ Formazione continua del personale e dimostrazione dell'elevata competenza tecnica
- ✓ In Europa lo schema flessibile adottato da anni e l'Ente di Accreditamento italiano non lo permetteva





# Vantaggi

- ✓ Stesura di una singola procedura invece di tante procedure quasi identiche
- ✓ In caso di allerte/immissione di nuovi eventi avere subito dopo la validazione del metodo la prova accreditata



# Validazione/Verifica dei metodi

## Cosa abbiamo verificato?

### PROVE QUALITATIVE

- ✓ LOD
- ✓ Sensibilità (solo se cambiato il metodo CRL o il metodo validato)
- ✓ Specificità (solo se cambiato il metodo CRL o il metodo validato)
- ✓ Robustezza (solo se cambiato il metodo CRL o il metodo validato)

### PROVE QUANTITATIVE

- ✓ LOD
- ✓ LOQ
- ✓ Precisione
- ✓ Esattezza
- ✓ Range dinamico, coefficiente  $R^2$  ed efficienza



# Verifica dei metodi:WG “Method Verification”

## Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods

Guidance document from the European Network of GMO laboratories (ENGL)

Prepared by the ENGL working group on “Method Verification”





# Come il CROGM applica il "Method Verification"

✓LOD: 10 replicati di PCR a basse concentrazioni (numero di copie 70, 35, 18, 9, 4, 2). Il LOD è la più bassa concentrazione dove tutti i replicati sono positivi.

✓LOQ: 10 replicati di PCR a basse concentrazioni (numero di copie 70, 35, 18, 9, 4, 2). Il LOQ è la più bassa concentrazione dove RSDr è  $\leq$  al 25%.

✓Precisione: 2 replicati di estrazione a due livelli (0,1% e 1%), i 4 replicati di PCR si caricano in quadruplicato su due piastre ottenendo 16 risultati di PCR per ogni livello %. Calcolo della RSDr % ai livelli 0,1% e 1%. Le RSDr devono essere  $\leq$  25% per l'1 e  $\leq$  50% per lo 0,1%.

✓Esattezza: sui 16 replicati di estrazione si calcola il BIAS. Deve essere  $\leq$  25%

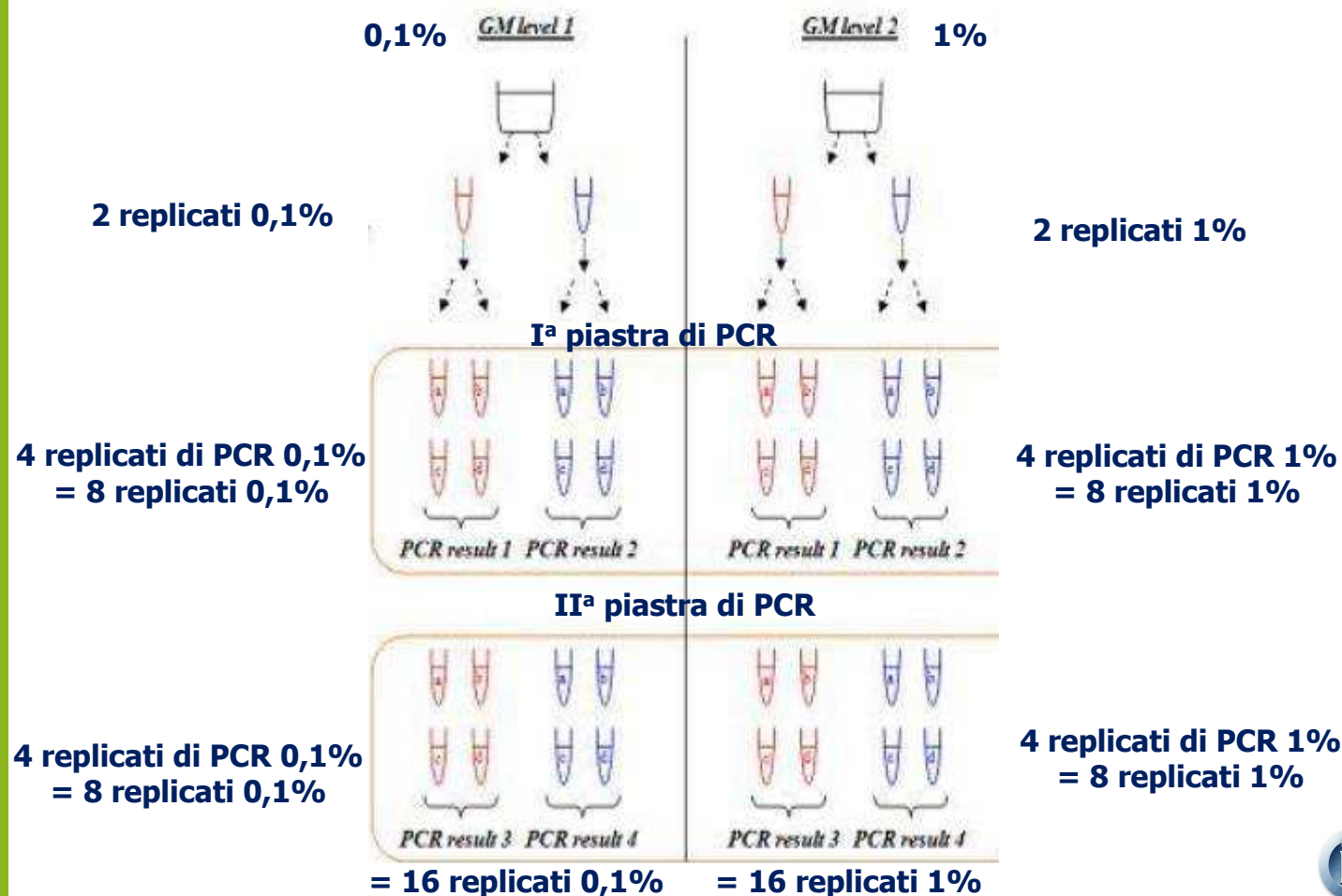
✓Linearità, Efficienza di amplificazione, Coefficiente  $R^2$ : parametri verificati sui 16 replicati di estrazione sia sul sistema endogeno che sul sistema transgenico.

*(Per la stima della precisione intermedia le corse di PCR vengono effettuate dallo stesso operatore in due giorni diversi o da due operatori nello stesso giorno)*



# SCHEMA GENERALE VERIFICA qPCR

(Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods Guidance document from the European Network of GMO laboratories (ENGL))





# PRODUZIONE DELLA CONCENTRAZIONE INTERMEDIA DEI MATERIALI POSITIVI

- ✓ Nel caso in cui non esiste in commercio la % del materiale positivo che dobbiamo utilizzare deve essere creato mediante mescolamento tra il positivo esistente ed il convenzionale.
- ✓ Può essere fatto dopo aver misurato il contenuto del gene endogeno, mediante curva di calibrazione, sia sul convenzionale che sul transgenico.
- ✓ In seguito a questa corsa di calibrazione, si può calcolare il fattore di diluizione per i due estratti di DNA secondo la seguente formula:

$$X = (A/B) * (Y-1) + 1$$

**X= fattore di diluizione pratico (fattore di diluizione che tiene conto del diverso contenuto del n° di copie del gene di riferimento nell'estratto GM positivo e nell'estratto GM negativo)**

**A= n° di copie del gene di riferimento nel DNA estratto GM positivo**

**B= n° di copie del gene di riferimento nel DNA estratto GM negativo**

**Y= fattore di diluizione teorico (per esempio dal 100% GM all'1%= 100x)**



# APPROCCIO DIRETTO NELL'UTILIZZO DEL CALIBRANTE



GMO quantification:  
Proper calibration and Estimation of Measurement  
Uncertainty

Course Material  
21& 22 November 2013



Joint  
Research  
Centre

✓ Per l'allestimento delle curve di calibrazione utilizziamo un materiale di riferimento certificato in massa ed allestiamo la curva di calibrazione in massa (ng) senza calcolare il n° di copie

Nella prossima rev. della POS VIR 040 la calibrazione del MON810 viene indicata in massa utilizzando l'ERM certificato in massa [g/kg]

(Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods Guidance document from the European Network of GMO laboratories (ENGL))

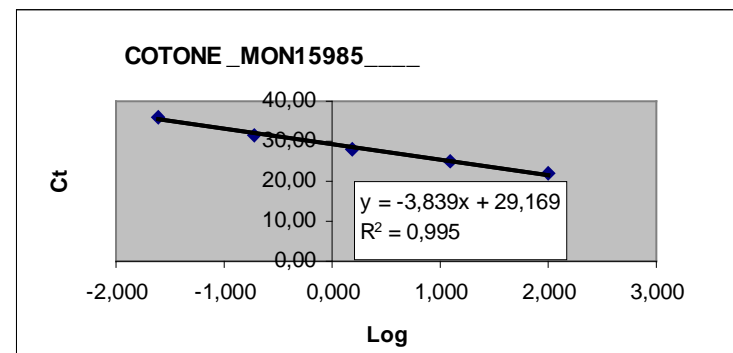




# ESEMPIO: qPCR MON 15985 in % m/m

<i>Standard impiegati</i>		<i>Diluizioni (μl)</i>	<i>Conc. DNA (ng/μl)</i>	<i>ng totali ENDOGENO</i>	<i>ng totali TRANSGENE</i>
<b>S1</b>	<b>(98.4%)</b>		20	100	98,4
<b>S2</b>	<i>(dil 1:8)</i>	6 <sub>S1</sub> + 42 <sub>TE</sub>	2,50	12,5	12,3
<b>S3</b>	<i>(dil 1:8)</i>	6 <sub>S2</sub> + 42 <sub>TE</sub>	0,31	1,56	1,538
<b>S4</b>	<i>(dil 1:8)</i>	6 <sub>S3</sub> + 42 <sub>TE</sub>	0,04	0,20	0,192
<b>S5</b>	<i>(dil 1:8)</i>	6 <sub>S4</sub> + 42 <sub>TE</sub>	0,005	0,02	0,024

Standard	Ct mean	Log ng
<b>S1</b>	21,91	1,993
<b>S2</b>	24,84	1,090
<b>S3</b>	28,00	0,187
<b>S4</b>	31,69	-0,716
<b>S5</b>	35,82	-1,619







# Domande?

Cristian Alimonti  
Pamela Bonini  
Cristiana Fusco  
Misto Marisa  
Cinzia Quarchioni  
Stefania Peddis



## GRAZIE PER L'ATTENZIONE



Email: [daniela.verginelli@izslt.it](mailto:daniela.verginelli@izslt.it)