



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e
Toscana

7 WORKSHOP DEI LABORATORI DEL CONTROLLO UFFICIALE DI OGM

Roma 11-12 maggio 2015

Annalisa
Paternò

AGGIORNAMENTI SULL'ATTIVITA' DI RICERCA DEL CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE PER LA RICERCA DI OGM



Centro di Referenza 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 differenti varietà di frumento italiane

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 e valutazione dell'espressione di tale enzima

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



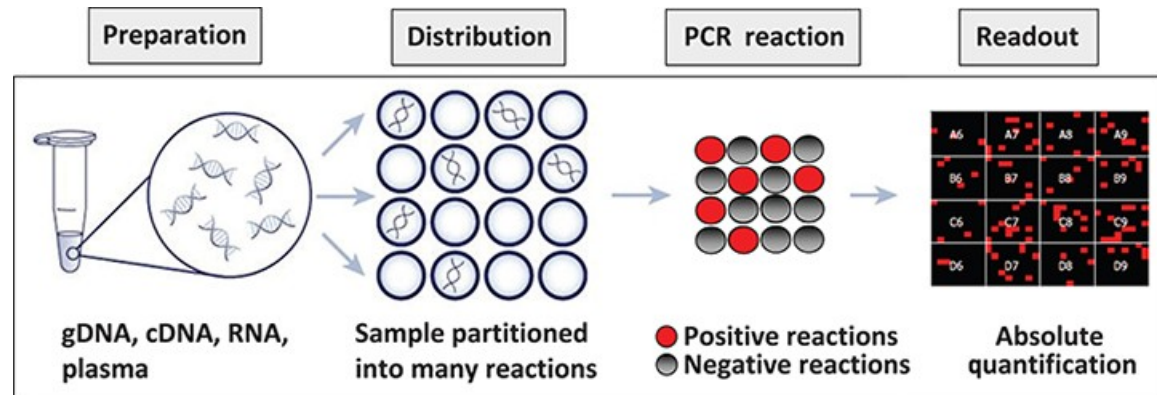
Geni endogeni

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



PCR digitale

- ◎ Quantificazione assoluta del numero di copie di target presente nel campione
- ◎ Assenza di una curva di calibrazione (necessaria per la quantificazione in real time PCR)





Ricerca corrente 2011

Work-package 2

Risultati ottenuti (analisi su 10 varietà)

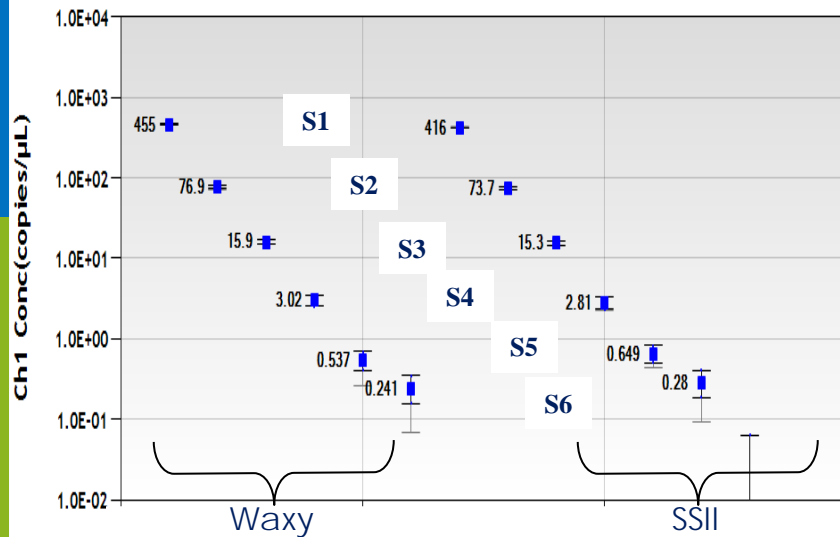
Sistemi waxy-D1 e ssl-D (per ciascuna varietà):

- ✓ ddPCR
- ✓ real time PCR

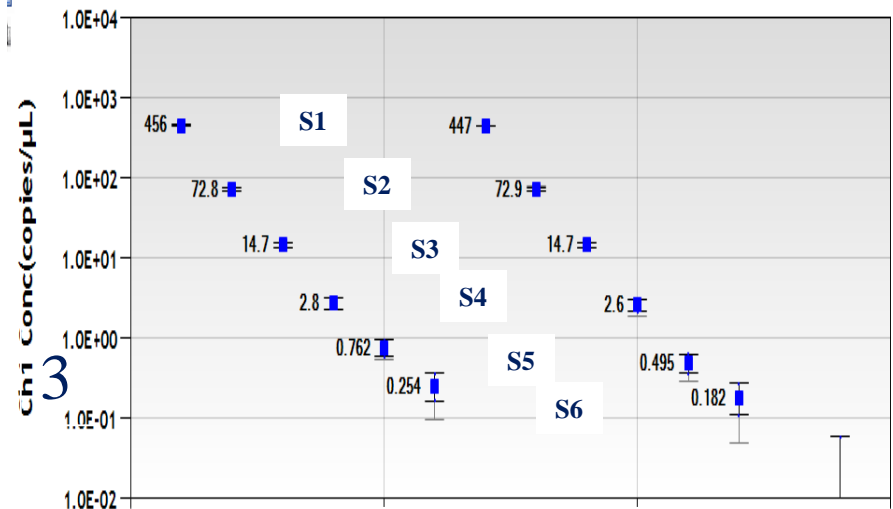
Diluizioni (n copie genomiche teoriche/ul)

S1:160ng	461,6	→ 4 replicati per ciascuna diluizione
S2: dil 1:5	92,3	
S3: dil 1:5	18,5	
S4: dil 1:5	3,7	
S5: dil 1:5	0,74	→ 8 replicati per ciascuna diluizione
S6: dil 1:2	0,37	

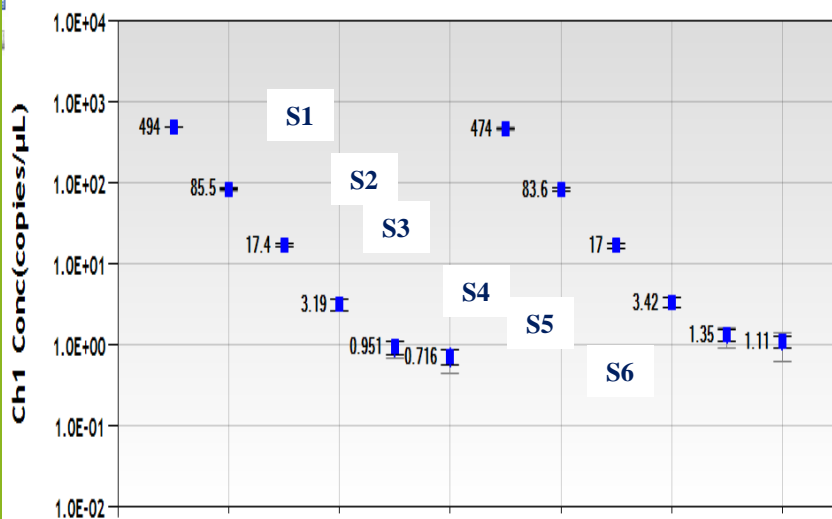
Varietà 1



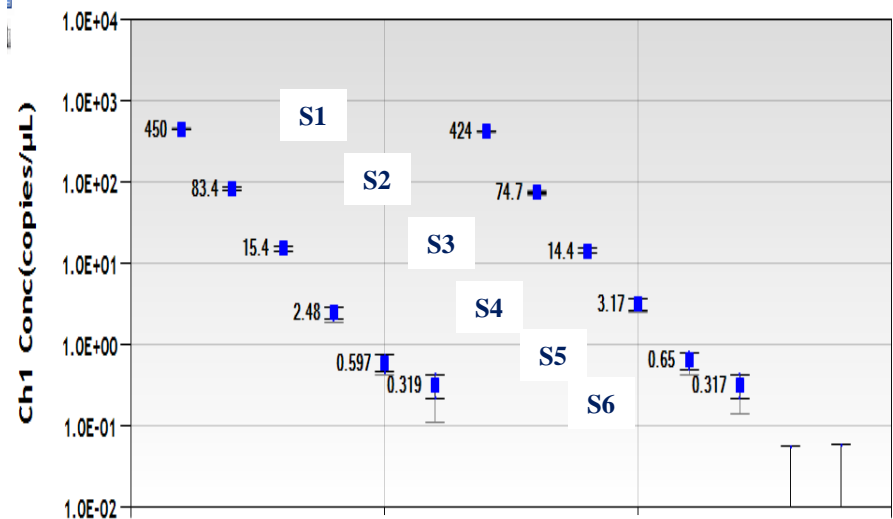
Varietà 2



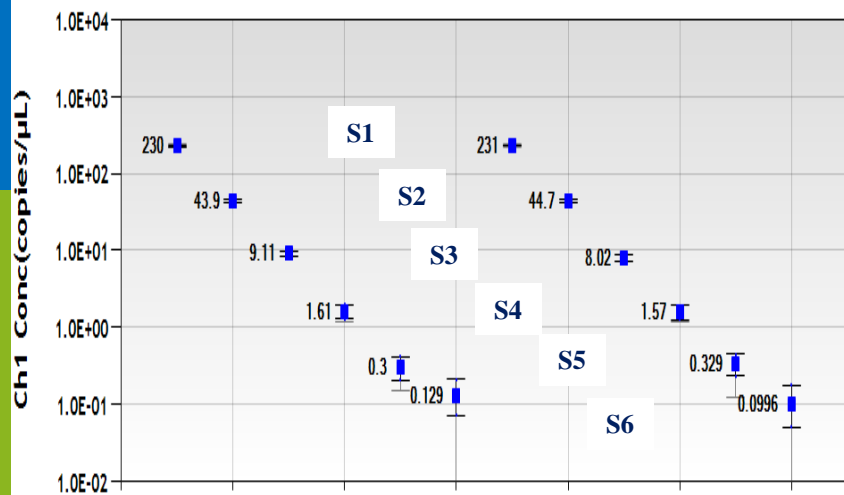
Varietà 3



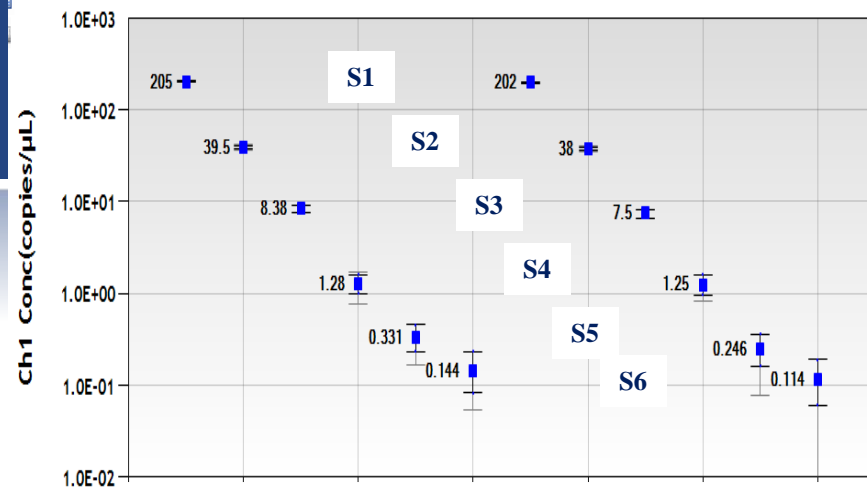
Varietà 4



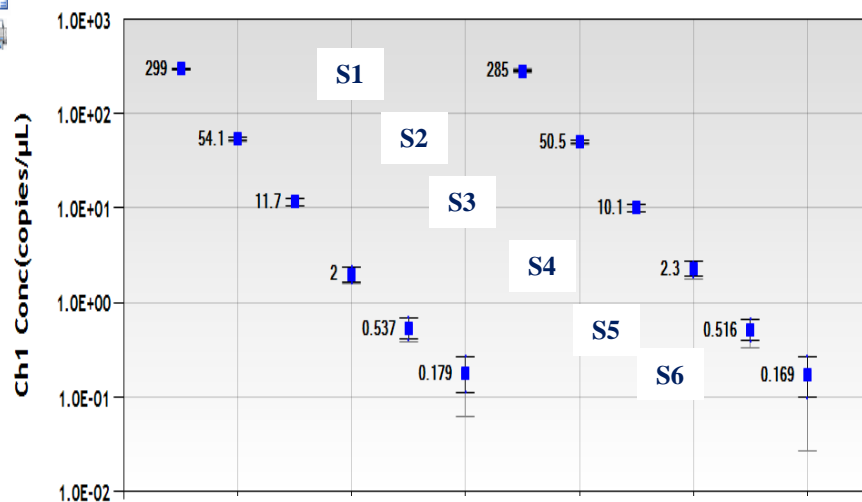
Varietà 5



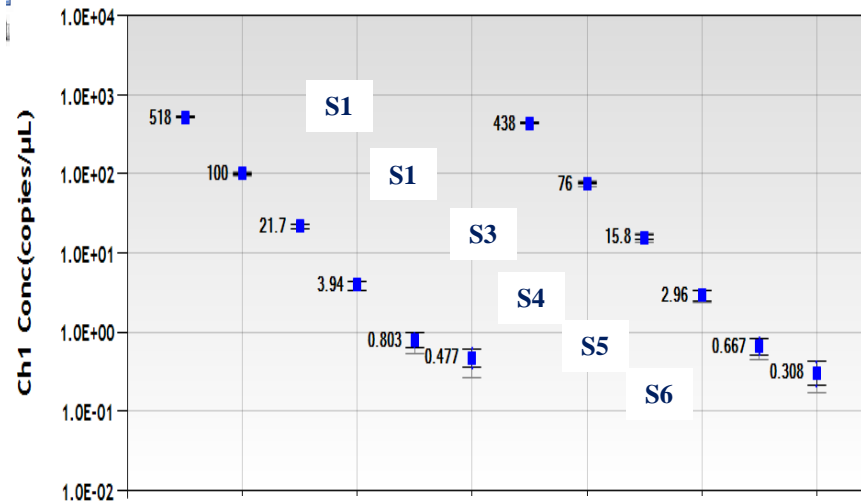
Varietà 6



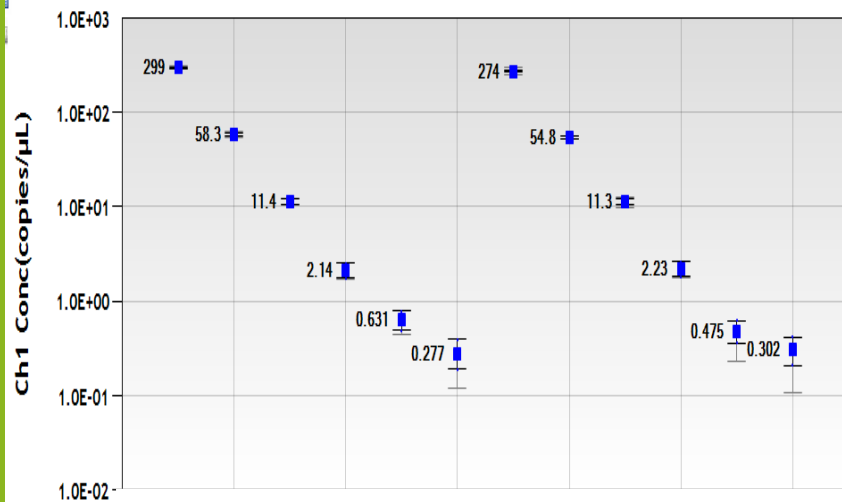
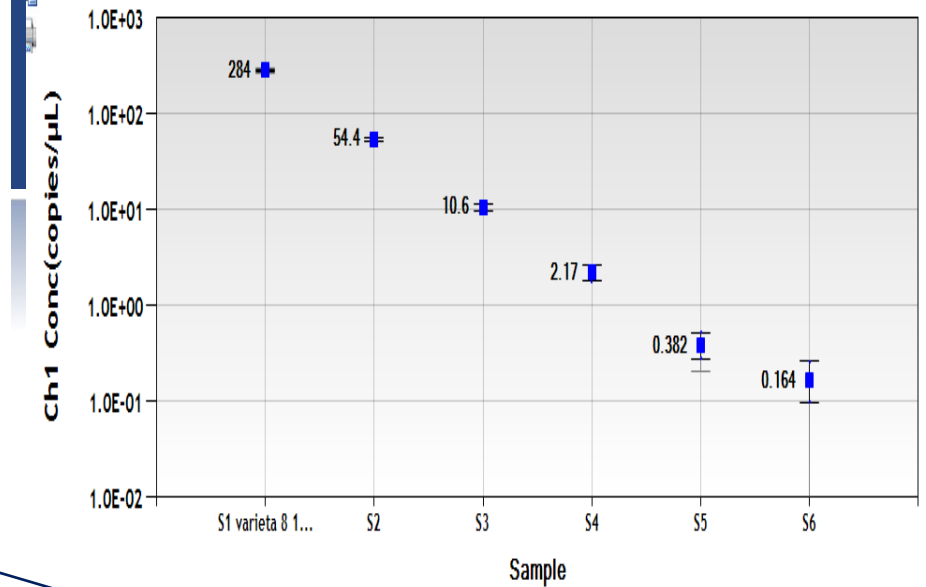
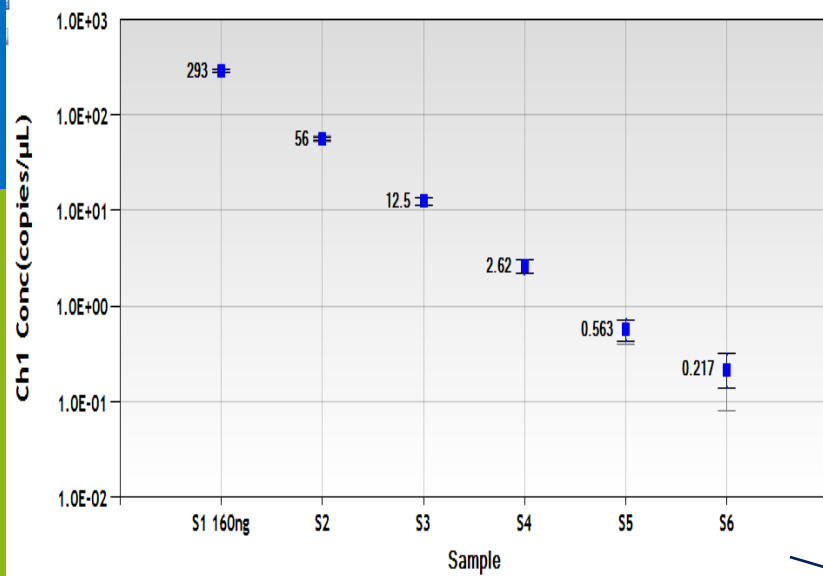
Varietà 8



Varietà 9



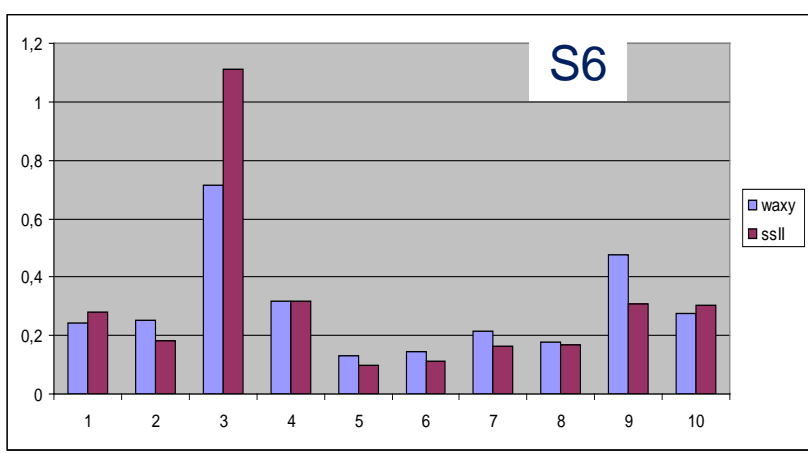
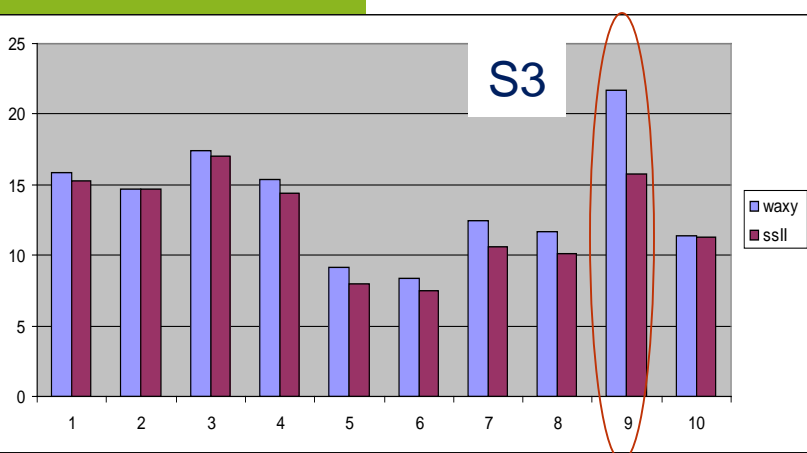
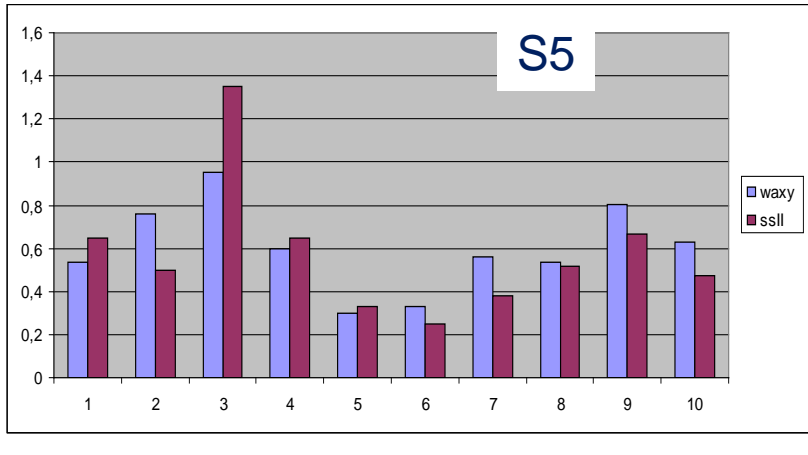
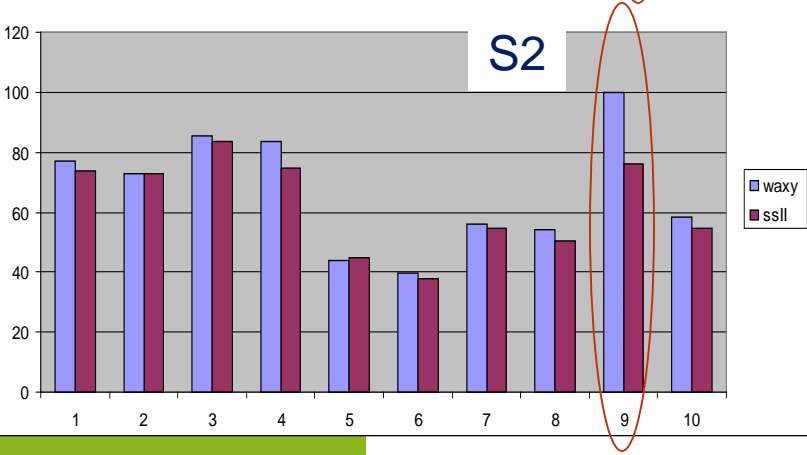
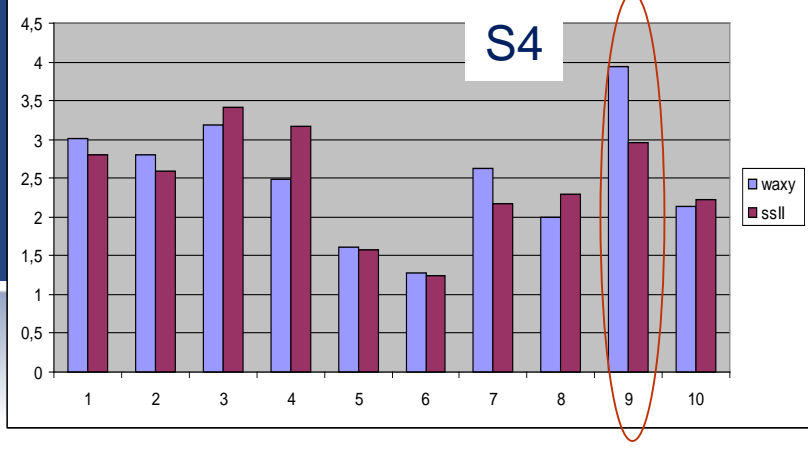
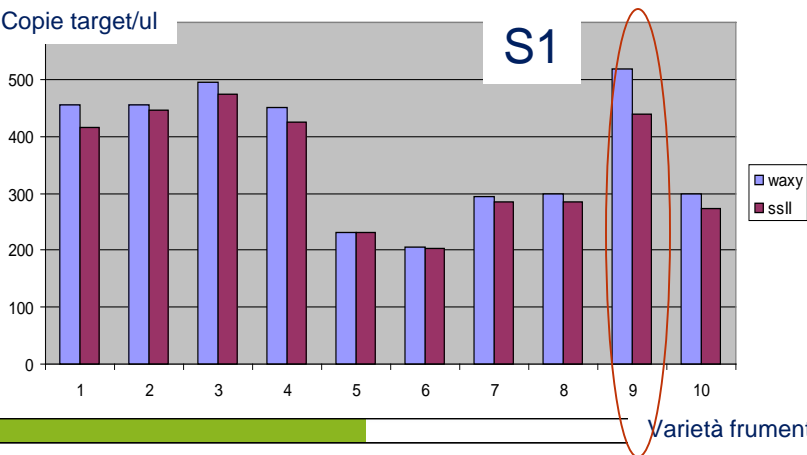
Varietà 7

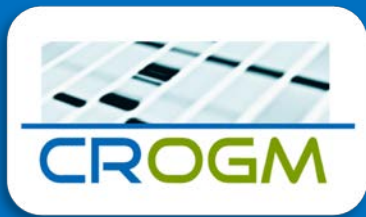


Sistema waxy e sistema SSII
in due corse differenti

Varietà 10

Copie target/ul





Ricerca corrente 2011

Work-package 2



- ⊙ Analisi delle rimanenti varietà di frumento inviate dal CRA
- ⊙ Sequenziamento della regione di appaiamento dei primers per ciascun sistema (waxy, ssl-D), per verificare eventuali mutazioni puntiformi che possono inficiare l'efficienza di PCR



Ricerca finalizzata 2009

Work-package 1 – Tracciabilità e autocontrollo

Work-package 2 – Controllo ufficiale





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





Work-package 1: Tracciabilità ed autocontrollo

- 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
- 1.5 sviluppo di **linee guida** per la segregazione della filiera OGM da quella non OGM
- 1.6 definizione di sistemi e procedure standardizzate da adottare da parte degli operatori per consentire la conservazione delle informazioni relative





Work-package 1: Tracciabilità ed autocontrollo



- 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
- 1.5 sviluppo di linee guida per la segregazione della filiera OGM da quella non OGM
- 1.6 definizione di sistemi e procedure standardizzate da adottare da parte degli operatori per consentire la conservazione delle informazioni relative



Risultati ottenuti(1)

- ✓ Analisi di differenti tipologie di mangimifici (4 aziende), per la produzione di mangimi GM e non GM nella provincia di Cuneo
- ✓ Tipologia aziendale: **Mangimificio Costamagna**
 - linea di produzione unica
 - produzione di mangimi completi e complementari non-GM per bovini da carne, prodotti su ordinazione in un unico giorno di lavorazione previa pulizia della parte d'impianto utilizzata
- ✓ Analisi ed identificazione dei punti critici





Work-package 1: Tracciabilità ed autocontrollo



Risultati ottenuti (2)

- ✓ Stesura di una check list d'impianto che tiene conto dei punti critici di controllo per la segregazione della filiera di produzione OGM da quella non OGM
- ✓ **Inserimento della check list** (in forma ridotta) **come allegato nel PNAA 2015-2017** da utilizzarsi per il censimento produttori NON OGM

Anno 201 ____ li _____

CHECK LIST CENSIMENTO IMPIANTO PRODUZIONE MANGIMI NON – OGM

1) DATI ANAGRAFICI ED INFORMAZIONI GENERALI

n. riconoscimento / registrazione

Ragione sociale _____
 Legale rappresentante _____
 Sede produttiva _____
 Data costruzione _____ data ultima ristrutturazione _____
 Tipologia produttiva _____
 Descrizione attività _____
 Quantificazione produzioni _____
 Materie prime non-OGM utilizzate _____

- produzione mangimi circuito biologico ☐ completi ☐ complementari ☐
- produzione mangimi non OGM ☐ completi ☐ complementari ☐

- dimensione del mercato servito mangimi non OGM
 - ☐ comunitario / paesi terzi _____
 - ☐ nazionale _____
 - ☐ regionale _____
 - ☐ locale _____

- giorni di lavorazione/orari mangimi convenzionali _____
- giorni di lavorazione/orari mangimi non OGM _____
- quantitativo annuo di mangime prodotto (ql) convenzionale etichettato OGM _____
 convenzionale non – OGM _____
 biologico _____

Linee guida per la segregazione della filiera OGM da quella non OGM



- ⊙ Introduzione e riferimenti normativi (Reg (CE)1829/2003; Reg(CE)1830/2003; Reg (UE)691/2013; Reg (CE)183/2005)
- ⊙ Tipologie di impianto (impianti totalmente separati; linee separate nello stesso impianto; un'unica linea di produzione ma con una gestione in tempi diversi delle produzioni convenzionali e non-GM)
- ⊙ Tipologie di mangimi (specie di destinazione e tipologia di materie prime)

Linee guida per la segregazione della filiera OGM da quella non OGM



- ◎ Identificazione punti critici (in correlazione alla tipologia d'impianto)
 - ✓ **materie prime** (tipologia e gestione; fornitori referenziati; piano analisi con riferimento alla 691/2013)
 - ✓ Gestione delle cross contaminazioni e/o contaminazione da carry over lungo la filiera
 - ✓ **Campionamento e analisi prodotto** finito(sulla base della valutazione del rischio)
 - ✓ Trasporto



Work-package 2: controllo ufficiale

2.1 definizione di linee guida per l'attività ispettiva

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

2.2.3 verifica della possibilità di ottimizzare le procedure di campionamento

2.2.4 valutazione conclusiva della praticabilità della procedura di campionamento

2.2.5 stesura di una procedura pratica di campionamento



Work-package 2: controllo ufficiale



2.1 definizione di linee guida per l'attività ispettiva

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

2.2.3 verifica della possibilità di ottimizzare le procedure di campionamento

2.2.4 valutazione conclusiva della praticabilità della procedura di campionamento

2.2.5 stesura di una procedura pratica di campionamento





Work-package 2: controllo ufficiale

Risultati ottenuti

- ✓ Valutazione della cross contaminazione e inquinamento lungo la linea di produzione (confronto tra la farina di soia in entrata e il mangime che esce dal miscelatore)
- ✓ Campionamento in modalità manuale ed automatica (Analisi in laboratorio dei campioni prelevati)





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





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

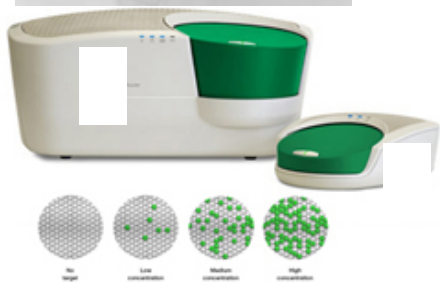




Work-package 2: controllo ufficiale

Risultati ottenuti

- ✓ Analisi e possibile applicabilità della **PCR digitale (quantificazione assoluta del target analitico)** alla routine diagnostica di OGM
- ✓ Confronto della **PCR digitale ad emulsione** con la real time PCR
- ✓ Determinazione del **LOD pratico** (ddPCR/ real time PCR) e calcolo del valore cut-off per il promotore 35S
- ✓ Sviluppo di metodiche **multiplex in PCR digitale**





Determinazione del **LOD pratico** (ddPCR/ real time PCR) e calcolo del valore cut-off per il promotore 35S

- ⊙ DNA:
mais MON810 2% (m/m), 0,77/(c/c)
soia 40-3-2 1% (m/m)
- ⊙ 7 diluizioni (6 replicati ciascuna)
- ⊙ 6 piastre real time
6 piastre ddPCR



Determinazione del **LOD pratico** (ddPCR/ real time PCR) e calcolo del valore cut-off per il promotore 35S



- © Possibili procedure alternative per la determinazione del cut off da indirizzare al network dei laboratori OGM



Controllo di etichettatura soia GM: PCR multiplex in ddPCR

Controllo di etichettatura soia:
Quantificazione assoluta della soia GM
autorizzata direttamente in digitale

Campione < 0,9%

Campione > 0,9 %

Campione regolamentare,
Fine del flusso analitico

?



Controllo di etichettatura soia GM: PCR multiplex in ddPCR

2 possibili approcci:

- A. Con il fluorocromo HEX identifichiamo la lectina e con FAM tutte le soie GM (senza distinzione delle popolazioni)
Miscela multiplex con primers e probe di tutte le soie e primers e probe lectina
- B. Due multiplex separate con HEX per la lectina e 3 soie GM che possiamo visualizzare utilizzando probe sempre FAM ma a concentrazioni diverse

Confronto con le quantificazioni dei singoli eventi di soia GM in real time PCR



Controllo di etichettatura soia GM: PCR multiplex in ddPCR

Problematiche

- ⊙ Materiali di riferimento contaminati
- ⊙ **Situazione reale diversa da quella utilizzata nello sviluppo della metodica**
(ogni materiale di riferimento contiene il target GM e il target lectina)



Materiali di Riferimento Certificati di soia GM (eventi autorizzati)

40-3-2	IRMM 10%
A2704	AOCS DNA 100%
MON89788	AOCS polvere 100%
A5547	AOCS DNA 100%
MON87701	AOCS polvere 100%
DP356043	IRMM 10%

Mat Riferim Cert	40-3-2	A2704	MON89788	A5547	MON87701	DP356043
40-3-2	+					
A2704	-	+	-	-	-	-
MON89788	+		+			
A5547	-	-	-	+	-	-
MON87701	+	-	+		+	
DP356043	+	-	-	-	-	+
+ Contaminazione						



Controllo di etichettatura soia GM: PCR multiplex in ddPCR

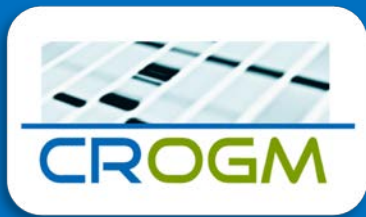
Risultati

- © Ottimizzazione dei metodi per la rilevazione della soia GM in ddPCR
- © Ottimizzazione delle metodiche in duplex (soia GM/ lectina)
- © Sviluppo triplex con lectina A5547 e A2704

Controllo di etichettatura soia GM: PCR multiplex in ddPCR



- ◎ Procedere con lo sviluppo delle multiplex (caso B)
- ◎ Analisi di campioni reali
- ◎ Circuito di validazione pilota



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

2.4.1 studio della teoria e di casi di applicazione pratica eventualmente disponibili

2.4.2 identificazione di requisiti generali e specifici per l'attuazione di un sistema di accreditamento a campo flessibile nell'ambito del controllo analitico di alimenti e mangimi GM

2.4.3 stesura di linee guida e procedure





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

2.4.1 studio della teoria e di casi di applicazione pratica eventualmente disponibili

2.4.2 identificazione di requisiti generali e specifici per l'attuazione di un sistema di accreditamento a campo flessibile nell'ambito del controllo analitico di alimenti e mangimi GM

2.4.3 stesura di linee guida e procedure



Linee guida per accreditamento in campo flessibile nell'ambito del controllo analitico di alimenti e mangimi OGM



- ⊙ Introduzione (riferimenti normativi, accreditamento a schema rigido e flessibile)
- ⊙ Requisiti generali (livelli e gradi di flessibilità, il laboratorio e la sua competenza, i metodi e la validazione dei metodi)
- ⊙ Applicabilità dello schema flessibile al laboratorio OGM (punti critici, vantaggi/svantaggi, esempi pratici)



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 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

2.5.3 sviluppo di una base dati per archiviare tutte le informazioni

2.5.4 definizione di una strategia di campionamento basata sul rischio lungo la filiera di produzione anche in relazione alle prevalenze osservate nei paesi d'origine e alle quantità di prodotto importate annualmente in Italia





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 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

2.5.3 sviluppo di una base dati per archiviare tutte le informazioni

2.5.4 definizione di una strategia di campionamento basata sul rischio lungo la filiera di produzione anche in relazione alle prevalenze osservate nei paesi d'origine e alle quantità di prodotto importate annualmente in Italia





Work-package 2: controllo ufficiale

Risultati ottenuti

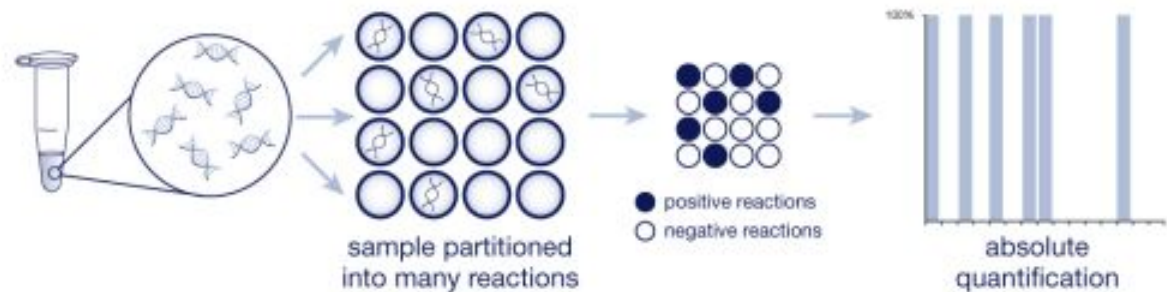
- ✓ Attività svolta in collaborazione con l'Osservatorio Epidemiologico (IZS Lazio e Toscana)
- ✓ Definizione delle matrici inerenti all'analisi OGM identificate con codici TARIC
- ✓ Fonti FAO e Ministero della Salute



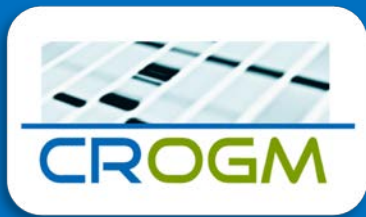


GRAZIE PER L'ATTENZIONE

PCR digitale



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

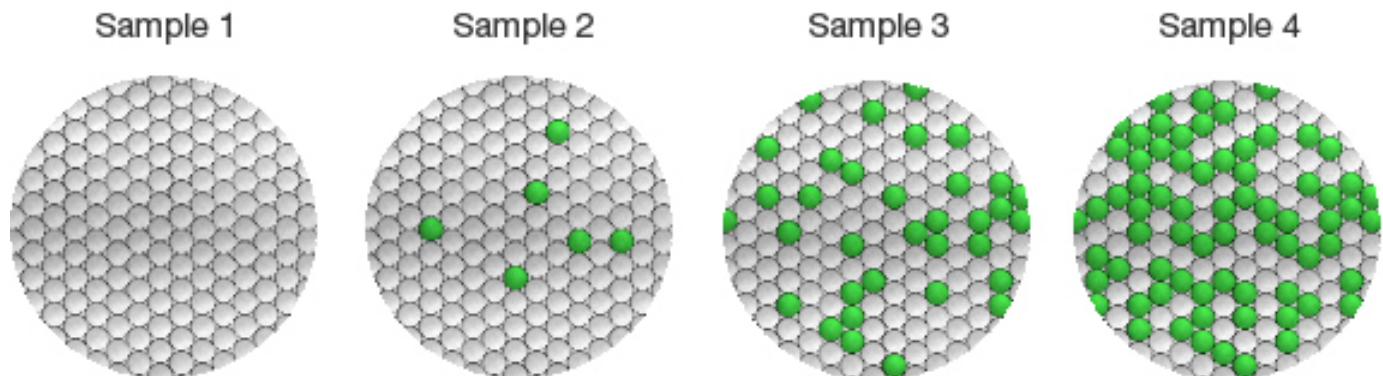
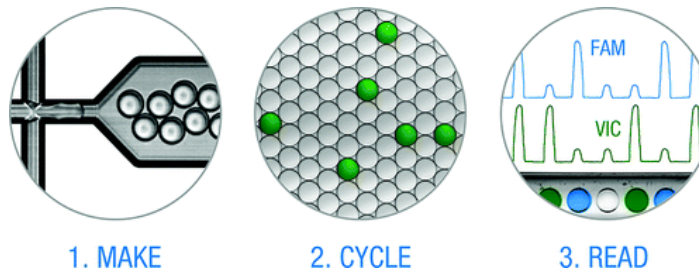


droplet digital PCR

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





droplet digital PCR

