



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e  
Toscana

# 5° WORKSHOP DEI LABORATORI DEL CONTROLLO UFFICIALE DI OGM

Roma 21-22 maggio 2013 Ministero della Salute

## 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 corrente 2010 (izslt 05/10)** “Tracciabilità ed etichettatura degli alimenti: sviluppo ed armonizzazione di metodologie analitiche biomolecolari per l’identificazione di specie”
- **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 lipossigenasi in relazione alla presenza di micotossine
- **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”



# Ricerche in corso

- ☐ **Ricerca corrente 2010 (izslt 05/10)** “Tracciabilità ed etichettatura degli alimenti: sviluppo ed armonizzazione di metodologie analitiche biomolecolari per l’identificazione di specie”
- ☐ **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 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 2010

## Obiettivi

- Acquisire dati relativi alle prestazioni di metodi di rilevazione e quantificazione della **specie soia** il cui uso è previsto nell'ambito del controllo ufficiale di OGM in alimenti e mangimi
- Individuazione di bersagli molecolari per la rilevazione ed eventuale quantificazione di **specie ittiche** d'uso alimentare con particolare attenzione a quelle GM in corso di autorizzazione in paesi terzi

# Ricerca corrente 2010

## Specie ittiche

- acquisizione del metodo DNA barcoding per le specie ittiche che fa riferimento alla procedura della Food and Drug Administration statunitense. Il metodo è stato cimentato con successo su diverse specie ittiche da diverse matrici biologiche
- Acquisizione di 7 metodi real time dalla letteratura per l'identificazione di 7 specie appartenenti alla famiglia *salmonidae* (in corso)
- eventuale quantificazione delle suddette specie con metodica real time PCR





# Ricerca corrente 2010

## Specie ittiche

**Salmone atlantico transgenico** AquAdvantage con fenotipo a crescita rapida:

- modello sviluppato da due università canadesi dal 1996 poi acquisito dal privato (AquaBounty)
- ultime fasi dell'autorizzazione in USA, da parte dell' FDA molto controverse
- ostilità da parte dell'opinione pubblica e anche da una parte della comunità scientifica



# Ricerca corrente 2010

## Metodi per identificazione soia (*glycine max*)

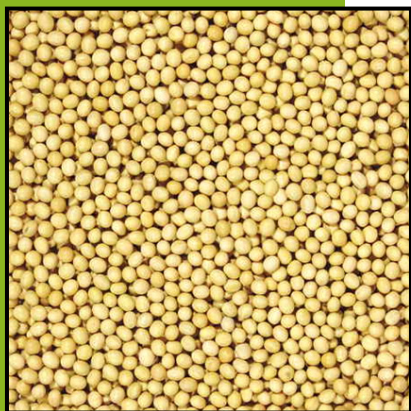
- ENSE ha fornito 20 varietà diverse di soia (38 campioni)
- individuazione di 8 metodi PCR che hanno come bersaglio la lectina
- Sequenziamento della regione del gene della lectina comprendente tutti i metodi, per valutare se esiste una variabilità genetica nella regione in oggetto (in corso)

Esiste variabilità genetica

NON esiste variabilità genetica

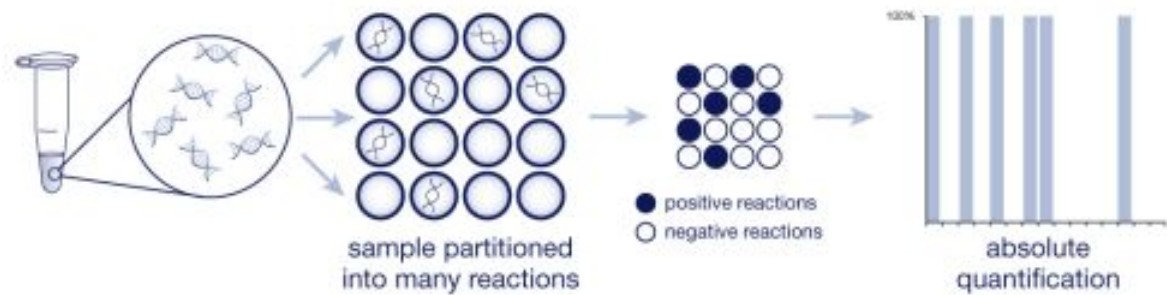
Scelta metodo con  
regione conservata

PCR digitale



# Ricerca corrente 2010

## PCR digitale







# Ricerche in corso

- ☐ **Ricerca corrente 2010 (izslt 05/10)** “Tracciabilità ed etichettatura degli alimenti: sviluppo ed armonizzazione di metodologie analitiche biomolecolari per l’identificazione di specie”
- ☐ **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 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

## **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

Campioni di frumento relativi a differenti cultivar forniti dall'ENSE

Riunione preliminare per stabilire programma di lavoro work-package1:

- Isolamento di eventuali agenti funginei presenti nei campioni
- Analisi delle micotossine
- Analisi dell'attività della lipossigenasi in differenti varietà di frumento con diversi livelli di infezione funginea

Work-package 2:

- Analisi del gene endogeno del frumento





# Ricerche in corso

- **Ricerca corrente 2010 (izslt 05/10)** “Tracciabilità ed etichettatura degli alimenti: sviluppo ed armonizzazione di metodologie analitiche biomolecolari per l’identificazione di specie”
- **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 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 finalizzata 2009

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

**Work-package 2 – Controllo ufficiale**





# Ricerca finalizzata 2009

## 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 (UU.OO. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9)

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

## **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 rel 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
- ☐ Calcolo del Ct entro cui ricade il 95% dei valori ottenuti per il livello LOD



# Ricerca finalizzata 2009

## **Ipotesi di lavoro1: determinazione del valore cut off Fase 2**

- ☐ Preparazione di DNA bersaglio (analizzata in PCR digitale) a concentrazione nota da trasferire a tutte le unità operative (UO) coinvolte
- ☐ Distribuzione alle UO del DNA bersaglio
- ☐ Allestimento delle diluizioni e analisi delle PCR real time (in conformità al protocollo ricevuto) da parte di ogni UO
- ☐ Esecuzione delle prove
- ☐ Calcolo del valore di Ct cut-off per ciascuna UO





# Ricerca finalizzata 2009

## **Ipotesi di lavoro 2: impurità botaniche in matrici mangimistiche**

- ❑ Individuazione delle specie botaniche rappresentate nelle formulazioni mangimistiche di uso corrente
- ❑ PCR digitale per le specie botaniche individuate e per un sistema specifico per DNA di origine vegetale (Laube et al 2010)
- ❑ Confronto in PCR digitale tra la singola specie vegetale e il sistema che identifica DNA vegetale
- ❑ Verifica della corrispondenza tra la quantificazione molecolare proposta e la reale composizione quantitativa peso/peso di formulati mangimistici ottenuti presso i mangimifici coinvolti nello studio sul campionamento (valutazione della necessità di introdurre fattori di correzione per le quantificazioni relative)



# 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

- ✓ Identificazione delle matrici inerenti all'analisi OGM
- ✓ Dati 2012 relativi a tutte le matrici importate relativamente all'alimentazione animale (PIF)
- ✓ Coinvolgimento dell'Osservatorio epidemiologico dell'ISZLT per la valutazione e l'analisi di questi dati preliminari



# 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

- Accreditemento flessibile da parte del CROGM a partire dalla metà del 2012



# Ricerca finalizzata 2009

## **Work-package 1 – tracciabilità e autocontrollo**

...

- 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)

## **Work-package 1 – tracciabilità e autocontrollo**

...

- 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

## **Mangimificio Costamagna**

- stesura di una check list d'impianto
- valutazione della cross contaminazione e inquinamento lungo la linea di produzione: installazione di autocampionatori in punti critici (precedentemente valutati) per il confronto tra campionamento manuale e automatico



Grazie per l'attenzione