

Tecniche di sotto campionamento per la formazione delle aliquote di legge e per la riduzione del campione di laboratorio.

**Corso "OGM: problematica, campionamento e risvolti analitici"
29 gennaio 2016 IZSVe, Legnaro Pd**

Roberta Onori

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
REPARTO OGM E XENOBIOTICI DI
ORIGINE FUNGINA
Roberta.onori@iss.it**

Sommario

- **Linee guida per la preparazione del campione**
- **Teoria del campionamento TOS**
- **Applicazioni al controllo ufficiale OGM**



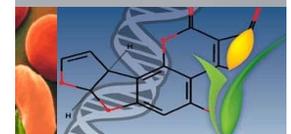


Guidelines for sample preparation procedures in GMO analysis

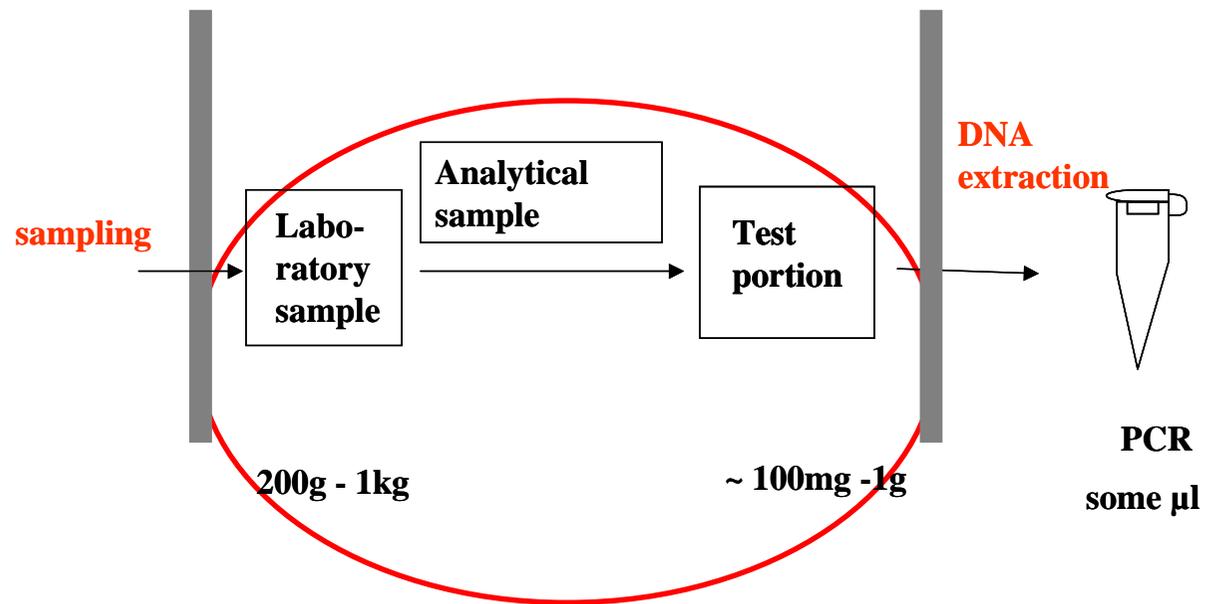
Prepared by the

ENGL *ad hoc* working group on “sample preparation procedures”

<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/ENGL/docs/WG-SPP-Final-Report.pdf>



Precedure utilizzate per la riduzione (sub-sampling) ed omogeneizzazione a partire dal campione di laboratorio fino ad ottenere l'aliquota da saggio



Documenti di riferimento

'Animal feeding stuffs - Guidelines for sample preparation' ISO 6498:2012

**Rivisto ed ampliato per l'applicazione
al settore analitico OGM**

CEN/TS 15568:2006 (E) ISO 24276:2006

Rec. (EC) No 787/2004

Regulation (EC) No 619/2011



The ultimate summary of TOS: 3 principles and 4 practical procedures

- Heterogeneity Characterization
- Variography (1-D characterisation)
- Lot Dimensionality Reduction

Normally used once
in planning /
optimization of a
sampling process

- Mixing / blending
- Particle Size Reduction
- Composite Sampling
- Representative Mass Reduction

Used as active steps
in the sampling
process (often used
several times)



Principio generale

Teoria del campionamento TOS

Errore legato alle caratteristiche del campione da analizzare

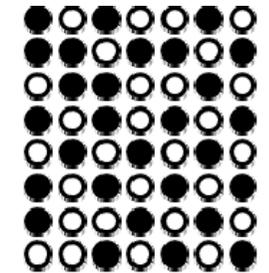
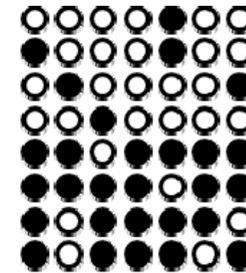
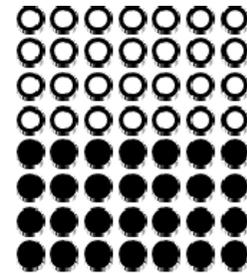
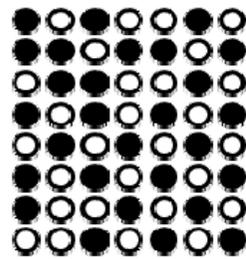
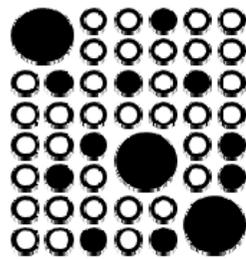
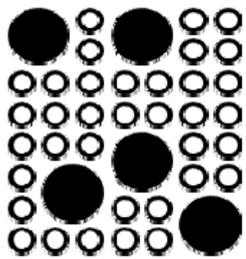
Errore legato alla riduzione del campione (sub-sampling)



Errore legato alle caratteristiche del campione da analizzare

Disomogeneità costituzionale

Distribuzione eterogenea



Constitutional heterogeneity

Distributional heterogeneity

macinazione

mescolamento



Esempi di disomogeneità costituzionale

Mangimi composti es fioccati



Muesli

Insalate miste



Esempi di distribuzione eterogenea

Micotossine contaminazione a sacche

OGM distribuzione stratificata in funzione della storia del lotto proveniente da residui di raccolti GM lungo la catena di produzione (es. stive, silos, camion....)



Sotto - campionamento

La riduzione del campione deve essere effettuata in modo rappresentativo

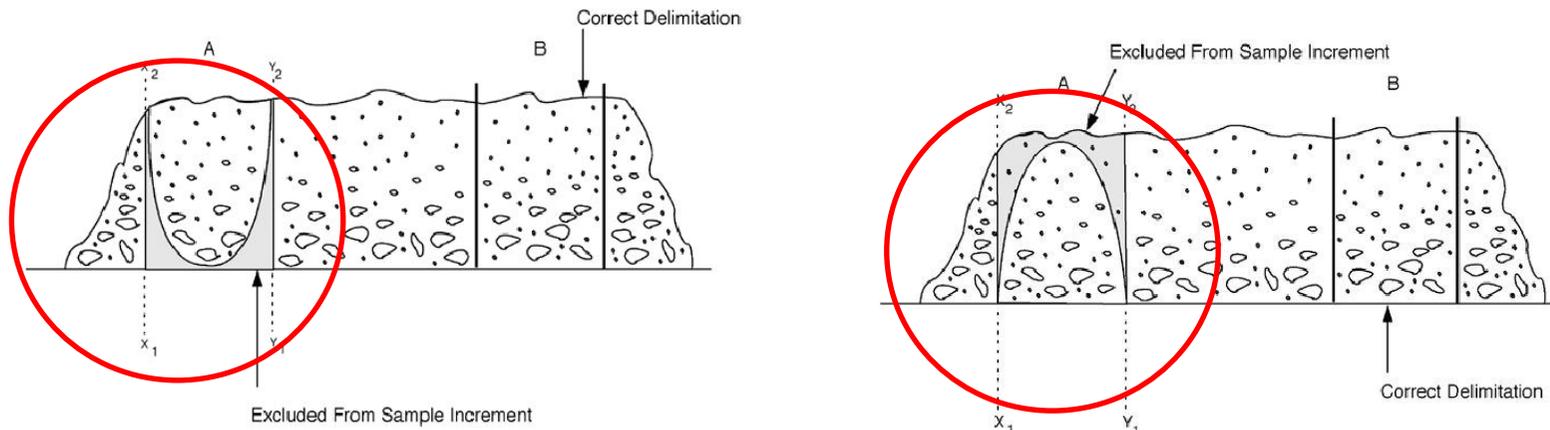
- **metodi di riduzione del campione idonei**
- **attrezzature idonee ad ottenere un campionamento rappresentativo**



Errore legato alla riduzione del campione

Derivante dalle attrezzature utilizzate per:

➤ Selezionare e prelevare gli incrementi



L'utilizzo di attrezzature non idonee per prelevare i campioni può determinare una selezione non corretta dell'incremento che comporta una discriminazione tra le frazioni che compongono il campione.

Alcune frazioni possono essere:

sovrarappresentate o sotto rappresentate



Attrezzature

Incorrect Design

Spatula



Flat without edges:
material segregates
when falling off
each side

Scoop



Round shape: material at the
top of a flattened sample has
more chance to be part of an
increment than the material
at the bottom

Shovel



Round shape: material at the
top of a flattened sample has
more chance to be part of an
increment than the material
at the bottom

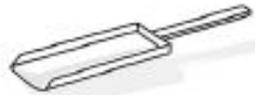
Correct Design

Spatula



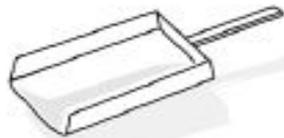
Square edges prevent
material from falling
off each side

Scoop



Square shape: all material
has the same chance to be
part of the increment

Shovel



Square shape: all material
has the same chance to be
part of the increment

Utensili per il campionamento

- Cucchiaini, spatole e pale

Per evitare errori nella selezione degli incrementi è necessario utilizzare attrezzature con bordo quadrato



Procedure di sotto - campionamento

Una riduzione dell'errore può essere ottenuta utilizzando in modo corretto le seguenti procedure per ridurre la massa del campione:

Composite subsampling (or incrementing)

Comminution (riduzione delle dimensioni delle particelle)

Mixing/blending

Limitano gli errori legati alle caratteristiche del campione da analizzare.

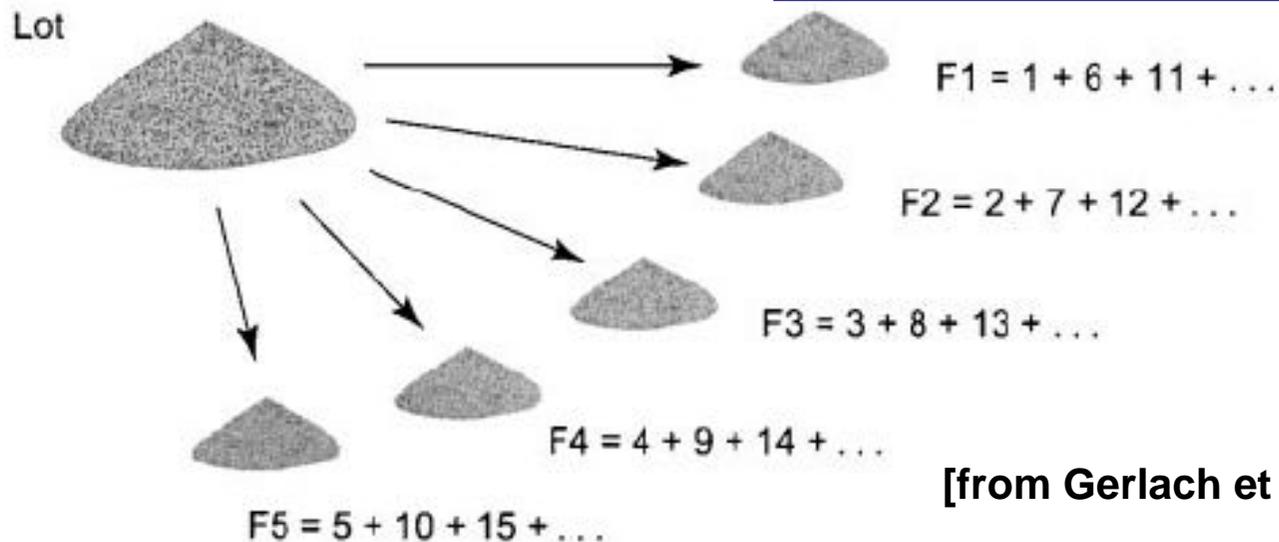


Metodologie consigliate

- fractional shovelling (10-30 scoops per pile)
- alternate shovelling = fractional shovelling with two piles

The technique consists in scooping the material and depositing it in an alternating way between two or more reservoirs/piles

Pile F1 gathers material scooped during step 1, 6, 11 and possible further steps

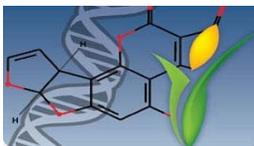
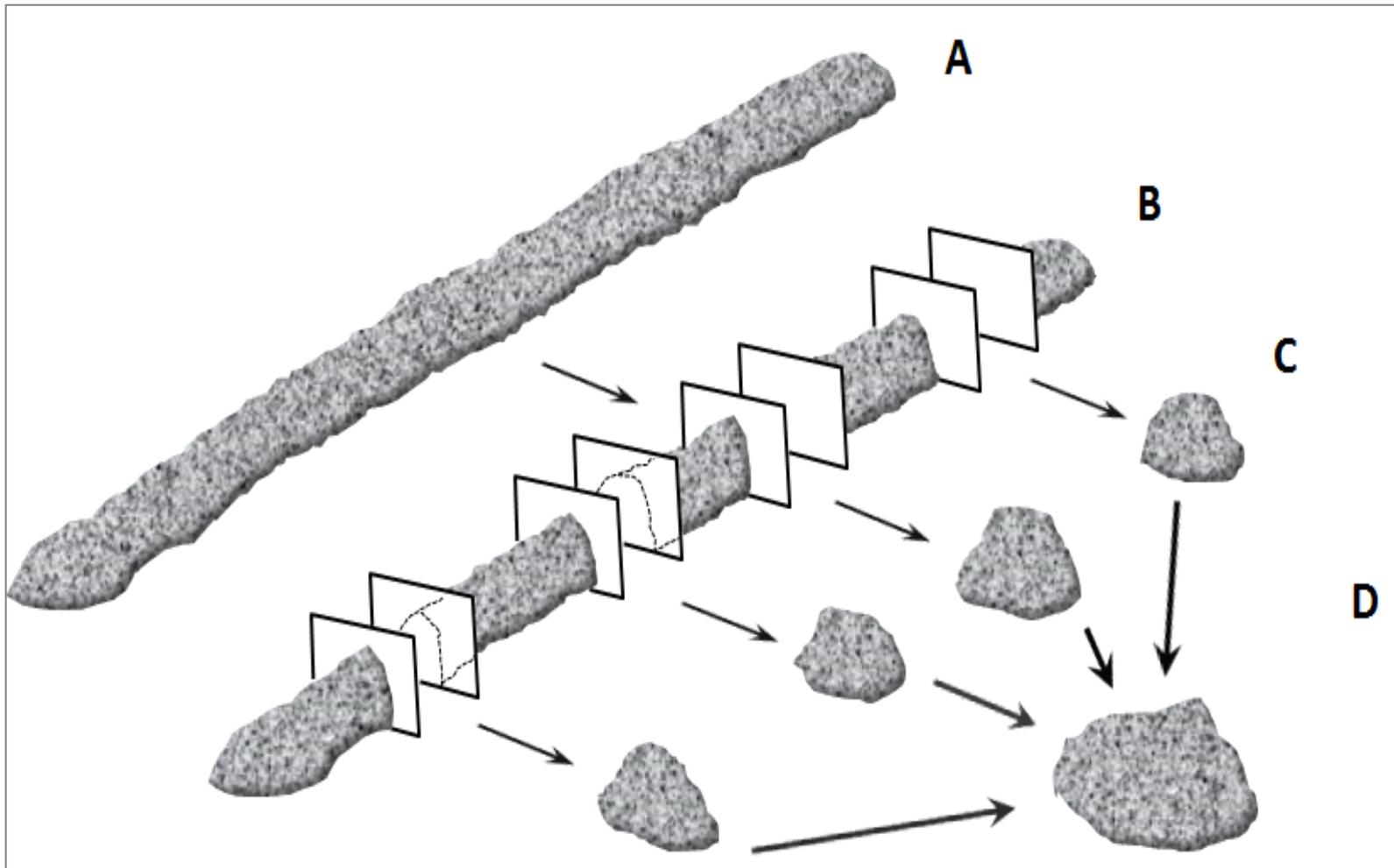


[from Gerlach et al. (2002)]



Metodologie consigliate

Long pile method



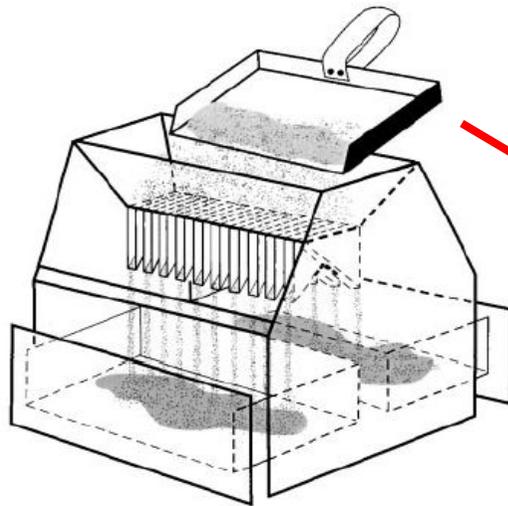
Numero di incrementi

Il numero di incrementi deve essere scelto in base all'ordine di grandezza dell'errore che si vuole accettare ed in base alle caratteristiche del campione

Come regola generale si raccomanda di prelevare almeno 10 incrementi quando non si hanno informazioni sull'eterogeneità del campione.



Procedure di sotto - campionamento



[from Gerlach et al. (2002)]



Macinazione

Coarse grinding (or pre-grinding)

- Quando un campione è formato da blocchi o le sue particelle hanno dimensioni superiori a **6 mm tutto il campione di laboratorio** deve essere **macinato**



Per questo step può essere utilizzato un sistema di macinazione in grado di permettere la macinazione di grandi quantitativi di campione e non è richiesta una granulometria fine



Annex II

Examples of grinders used by laboratories involved in GMO

Brand (of the grinder)	Retsch	Retsch	Vorwerk
Type	ZM200	Grindomix GM200	Thermomix 21
Maximal capacity that can be ground at once (in grams unless other unit used)	Up to 300 ml with standard cassette (4500 ml with cyclone)	Up to 700 ml	2000 (depending on mass and volume)
Number of laboratories using this equipment	5 (7)*	3	1
Is there any integrated system for size control of particles?	<u>Yes (due to sieve)</u>	No	No
Easiness of cleaning When a sample is ground. How long does it take to have all cleaned and ready for the next sample?	Difficult 15-60 min (depending of the mesh-size, material used); Time reduction when using extra containers/sieves and rotors	Medium 10 minutes Time reduction when using extra blades and bowls	Simple 1-5 min (pot, lid, blade) Time reduction when using extra pots/blades and dishwasher
Are there matrices that do not fit?	Oily and fatty material (e.g. linseed), depending on the mesh-size (difficult with sieves below 1 mm); Particles of sample should not exceed 10 mm.); Not suitable for very hard material as well as pasty material	Not suitable for very hard material	Soft/elastic material (e.g. fresh leaves)
Additional remarks (if any)	Additional mixing step necessary when using cyclone; Can reach a final fineness of < 40 µm Use of an ultrasonic cleaner helps to wash the sieves	Can generally reach a final fineness of < 300 µm	Minimum quantity/volume of material necessary

Annex II

Examples of grinders used by laboratories involved in GMO

Brand (of the grinder)	IKA	IKA	Maxi Grinder	Waring
Type	A11 basic	M20	Solo	Blender, 1, 2 and 4l capacities
Maximal capacity that can be ground at once (in grams unless other unit used)	250 (depending on mass and volume)	500 (depending on mass and volume)	2000 (depending on mass and volume)	From 200 to 2000 according to the capacity
Number of laboratories using this equipment	1	1	1	1
Is there any integrated system for size control of particles?	No	No	No	No
Easiness of cleaning When a sample is ground. How long does it take to have all cleaned and ready for the next sample?	Simple 3-5 min	Medium 5-10 min	Simple 3-5 min Time reduction when using extra containers/blades and dishwasher	Medium 10 min
Are there matrices that do not fit?	Soft/elastic material (e.g. fresh leaves)	Soft/elastic material (e.g. fresh leaves)	Soft/elastic material (e.g. fresh leaves)	Matrices with high content of fat are difficult to grind; the grinding speed must be decreased
Additional remarks (if any)	Fit for small quantities	/	Challenging handling, minimum quantity/volume of material necessary	In order to facilitate the work, several blades and bowls are needed

Macinazione

La scelta del sistema di macinazione deve essere effettuata in base a:

- **Requisiti di granulometria del campione (se previsti)**
- **Necessità di mantenere l'integrità dell'analita nel campione**

Esempi pratici

Mulini con un sistema di setacci integrato sono in grado di consentire il controllo delle dimensioni delle particelle indipendentemente dalla matrice da macinare

- Quando si effettuano step successivi di macinazione è consigliabile utilizzare un fattore 4 per la scelta delle dimensioni dei setacci ad esempio per la soia prima macinazione 2 mm seguita da 0.5 mm;



Tecniche di mescolamento

Esempi pratici

I sistemi di mescolamento possono in alcuni casi favorire la segregazione, soprattutto per i materiali con dimensioni divergenti per dimensioni e/o densità.

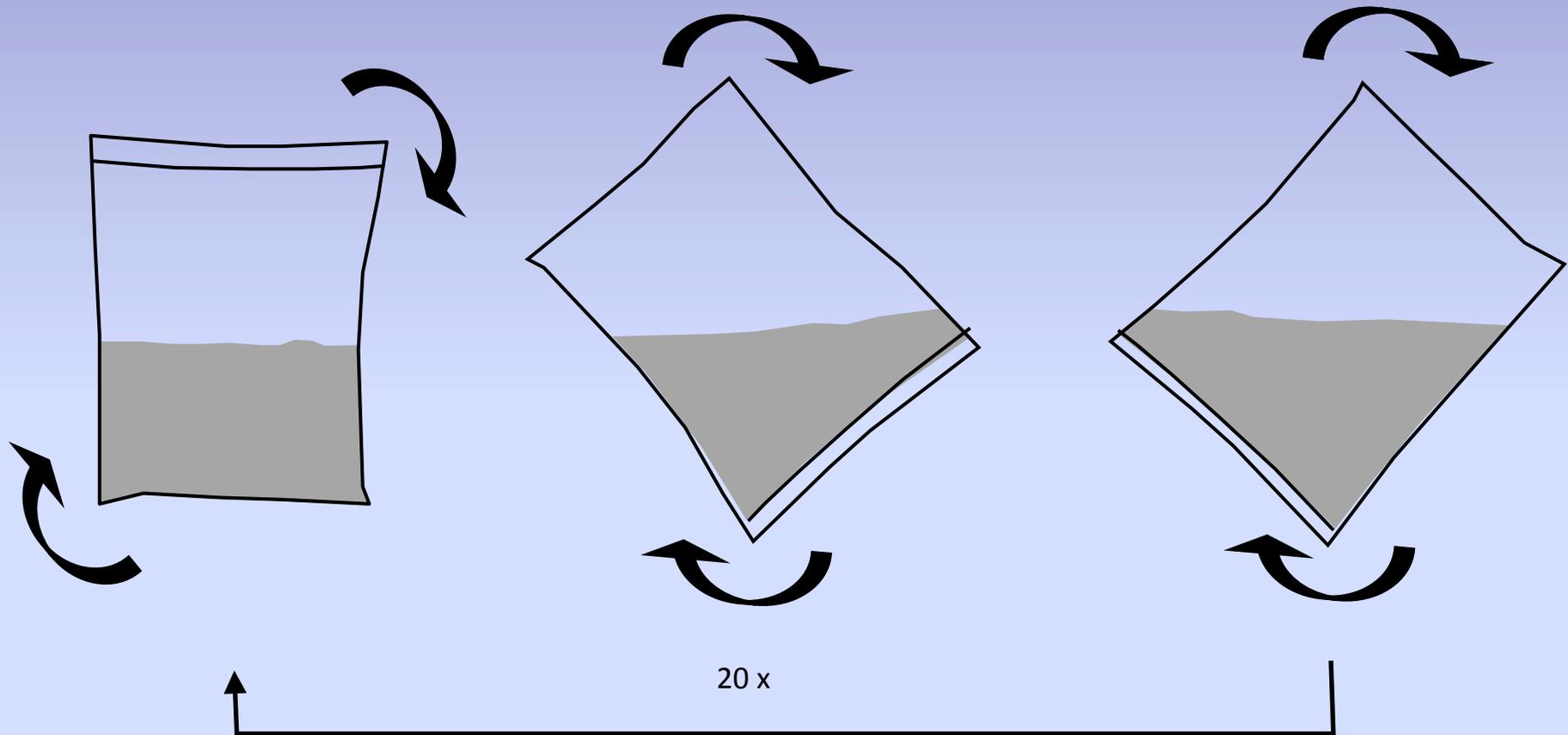
Non è corretto mescolare per scuotimento, in contenitori troppo pieni, i campioni macinati, perché:

- il contenuto sul fondo non viene mescolato accuratamente
- Si rischia di favorire la segregazione aumentando l'errore di sottocampionamento

I contenitori devono essere riempiti per un terzo della loro capacità



Omogeneizzazione per mescolamento: tecnica della busta



Tecniche suggerite per alcune matrici particolari

Campioni viscosi

Riscaldare a 40-60°C migliora l'omogeneità e di conseguenza la rappresentatività dei campioni viscosi (es. miele e lecitine).



Campioni liquidi

I campioni liquidi sono generalmente considerati omogenei. Possono però esserci delle eccezioni: per l'olio è consigliato il metodo descritto da Costa (Costa et al.2010) che prevede una centrifugazione a circa 18.000 g per 30 min, seguita da estrazione su pellet.



Tessuti di origine vegetale

Due differenti procedure sono applicabili: l'uso dell'azoto liquido seguito da frantumazione del materiale con un pestello; congelamento (più di un giorno) seguito da macinazione del campione.



Matrici semisolide

Per alcune matrici semisolide con meno dell'85% di materia secca (es. foraggio, pane fresco) è necessario disidratare parzialmente prima della macinazione, utilizzando un forno con ricircolo di aria o un microonde. E' importante mantenere la temperatura sotto i 55-60 °C per ridurre al minimo la degradazione del DNA



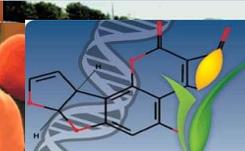
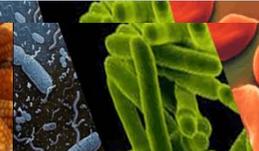
Aliquota da saggio

Mescolamento del campione di laboratorio o del campione ridotto prima della pesata dell'aliquota da saggio

Il campione deve essere mescolato in modo corretto o manualmente o con sistemi dedicati subito prima della pesata



A questo livello il campione è stato accuratamente omogeneizzato, quindi il prelievo può essere effettuato in modo casuale.



Dimensioni dell'aliquota da saggio

Minimum mass of test portion

Theoretical calculations of the minimum mass of the test portion: **expected relative standard deviation (RSD)** linked to the **maximum particle size** (assumed density of 1 g/cm³) - data adapted from ISO 6498:2012. The yellow cells are those compatible with common sample intakes for DNA extraction (maximum 5 g).

FSE (expected RSD) Maximum particle size (d)	25%	20 %	10 %	5 %	2 %	1 %
0.5 mm	0.02 g	0.03 g	0.13 g	0.5 g	3 g	12.5 g
0.75 mm	0.07 g	0.1 g	0.42 g	1.7 g	10.5 g	42 g
1 mm	0.16 g	0.25 g	1 g	4 g	25 g	100 g
2 mm	1.28 g	2 g	8 g	32 g	200 g	800 g
3 mm	4.3 g	6.7 g	27 g	108 g	672 g	2688 g
4 mm	10.2 g	16 g	64 g	256 g	1600 g	6400 g

Peso dell'aliquota da saggio
minino 200 mg
massimo 5 g



Sistemi di pulizia

Pennelli e spazzole per la pulizia di mulini

Aria compressa

Aspirapolveri

Bagni ad ultrasuoni per la pulizia di setacci

Soluzioni per la decontaminazione delle superfici

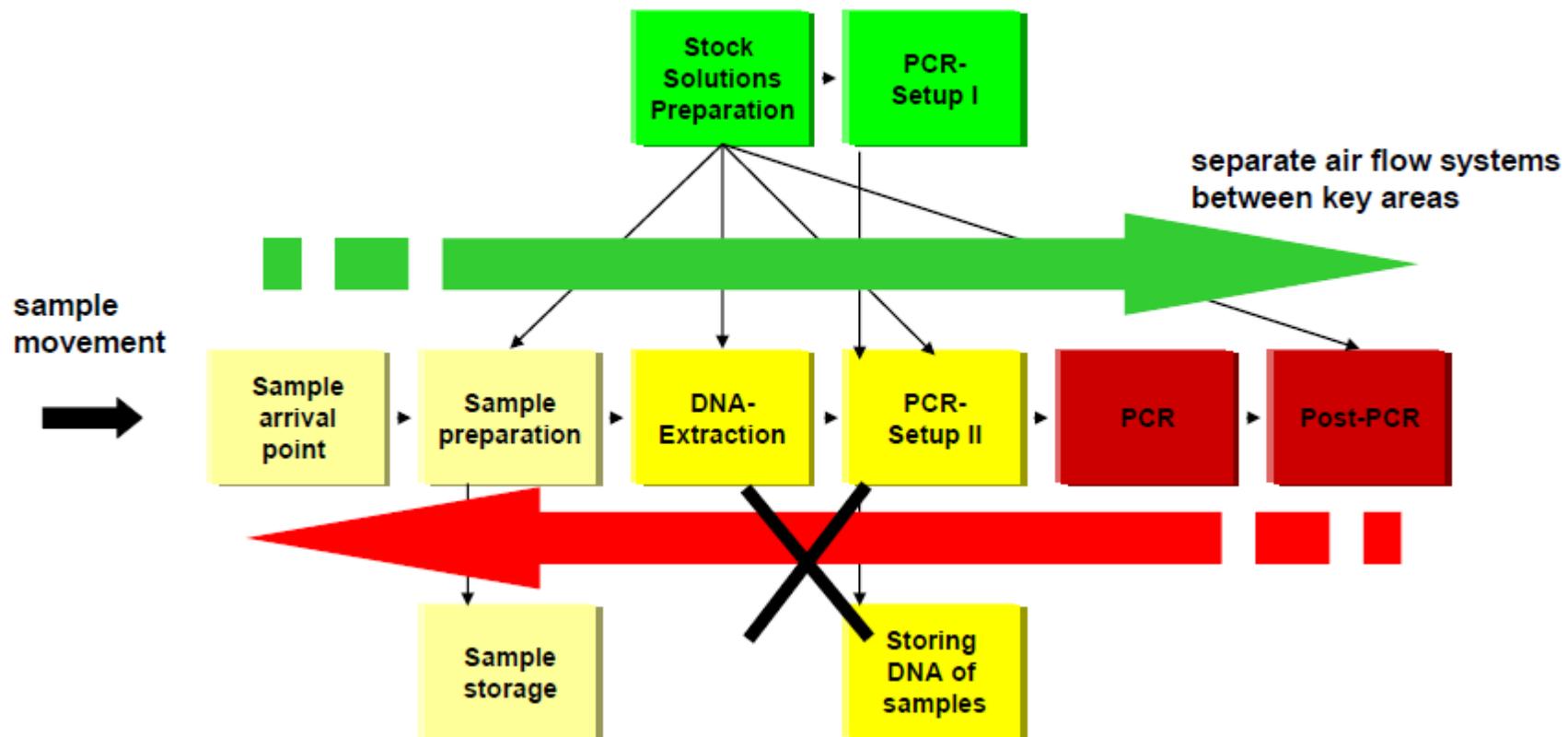


Gestione della cross-contaminazione

Ambienti di laboratorio

ISO Standard 24276:2006,

Forward-Flow-System



Gestione della cross-contaminazione

Sistemi di prevenzione e di sicurezza

- sistema di ventilazione durante le operazioni che determinano la formazione di polveri
- aspirapolveri per la pulizia di cappe e ambienti di lavoro.
- Sistemi di protezione dall'inalazione di polvere soprattutto durante la macinazione di semi trattati con fitofarmaci o di piante potenzialmente allergeniche es. soia.



Controlli di qualità

Verifica dell'efficienza dei mulini

Per i sistemi di macinazione con setacci è consigliato effettuare, su base annuale, test di performance verificando che almeno l'80 % delle particelle ottenute abbia un diametro inferiore alla metà della dimensione del setaccio (riso o grano)

Verifica del controllo della contaminazione

Analisi di campioni negativi dopo il trattamento di campioni positivi con un contenuto di OGM superiore al 5%, previo utilizzo delle normali procedure di pulizia del sistema di macinazione.

Una specie per cui non esistono varietà commerciali GM ad esempio il grano può essere utilizzata come campione negativo.



The LOD/LOQ of the whole analytical process

Grind **three different samples**, each consisting of **one GM kernel in n kernels of the same non GM species**. Or different species of similar size (e.g. maize and soy, tomato and rapeseed, wheat and barley).

From each grinding, **perform 6 DNA extractions, 18 extractions** in total.

Then perform a PCR (targeting either the GM event or the other plant species) on the 18 extractions. If they are **all positive** then $1/n$ will be the limit of detection of the whole analytical process.

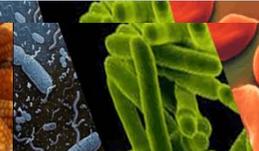
grinding

grinding

grinding



LOD all PCR results positive
LOQ relative standard deviation that does not exceed 25%.



Piani di controllo

Piano Nazionale di controllo degli alimenti GM 2015-2018



Piano Nazionale di controllo dei mangimi (capitolo OGM) 2015-2017



Piani Regionali



FORMAZIONE DELLE ALIQUOTE DI LEGGE PNAU OGM allegato 5

Alcune indicazioni sulle procedure per la formazione delle aliquote sono riportate nella **tabella delle matrici (allegato 3)** che suddivide le matrici in due categorie in base alla distribuzione degli OGM nel prodotto:

1. alimenti caratterizzati da una distribuzione non omogenea degli OGM

2. alimenti caratterizzati da una distribuzione omogenea degli OGM.

Nel caso 1, le operazioni di omogeneizzazione del campione globale per la formazione dei campioni finali devono essere effettuate:

- **previa macinazione dell'intero campione globale.**
- **prodotti confezionati**, secondo quanto previsto sia nel DPR 26 marzo 1980, n. 327 allegato A § 3 lettera e), prevede che le confezioni di prodotti non omogenei, in numero rappresentativo secondo quanto sopra indicato dal piano di campionamento, vengano **aperte, riunite, mescolate e accuratamente macinate prima di formare le aliquote per le analisi del controllo ufficiale.**

Nel caso 2, le confezioni prelevate al dettaglio costituiscono le aliquote di legge



TABELLA MATRICI allegato 3

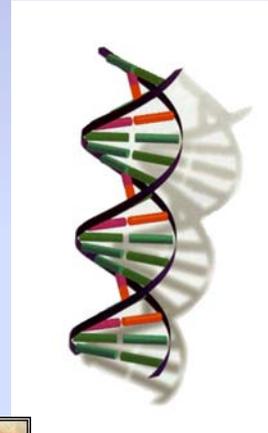
Foode x	Principali gruppi alimentari	Esempi	codici TARIC	Distribuzione omogenea di OGM nel prodotto	Distribuzione non omogenea di OGM nel prodotto Prodotti che richiedono macinazione + omogeneizzazione
A.01	Granelle, creme e farine di mais, di riso e miste	mais per popcorn, farine di mais, di riso e miste	0709 90 60 granturco dolce (Granella di mais); 1102 20 Farina di granturco/mais ; 1102 90 50 Farina di riso	farine di mais, di riso e miste	granelle, mais per popcorn, granturco dolce (Granella di mais)



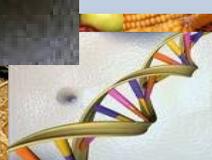
Formazione dei campioni finali

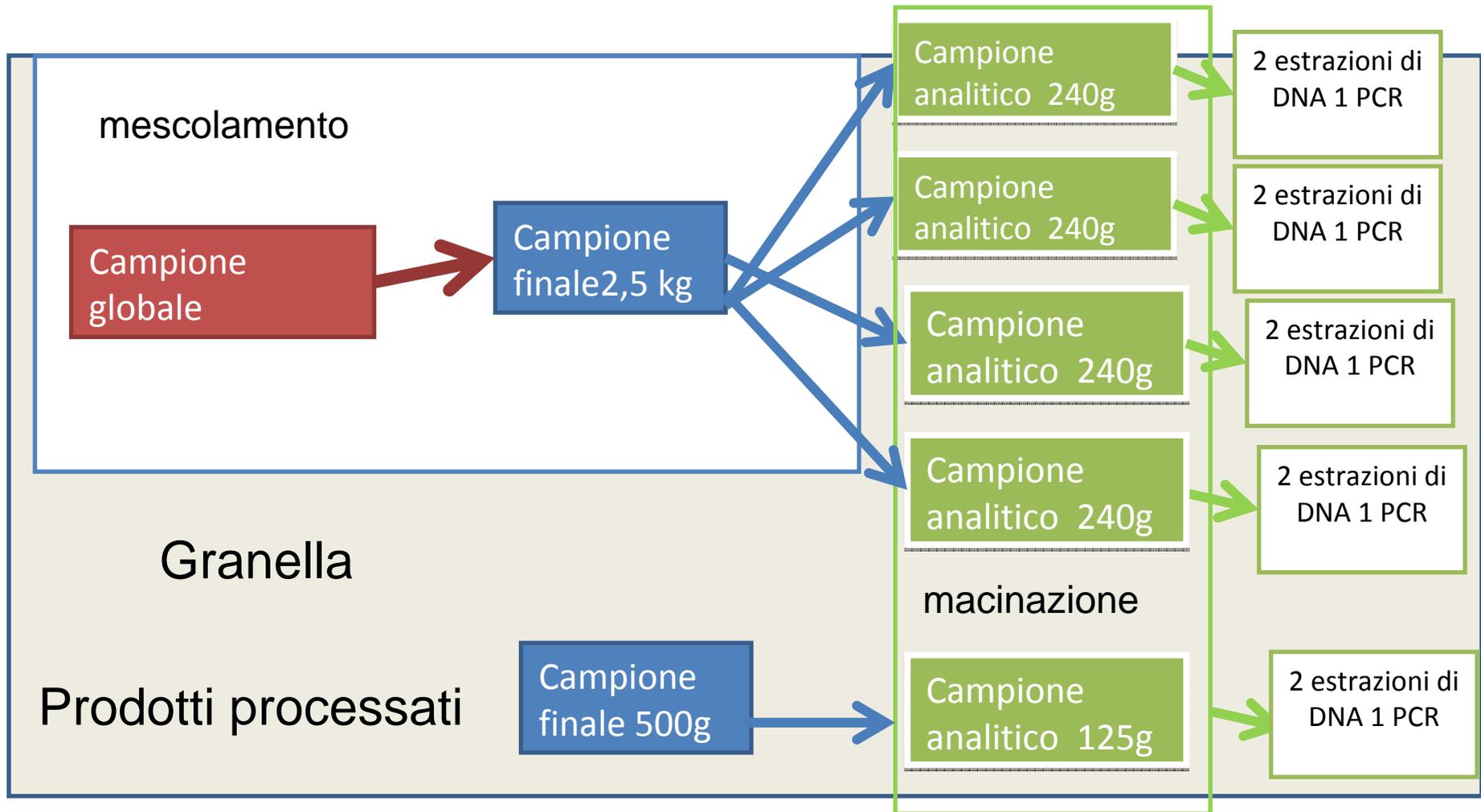
Al fine di garantire una distribuzione uniforme dell'analita nei CF, **le operazioni di macinazione devono essere effettuate o sul campione globale opportunamente omogeneizzato o sul campione ridotto** salvo diverse disposizioni derivanti da normative specifiche.

Decisione 2013/287/UE – prodotti di riso provenienti dalla Cina

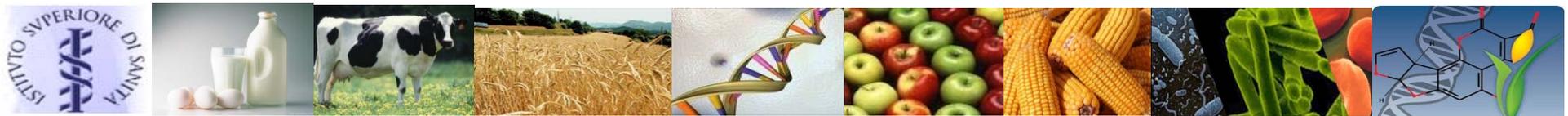


Campione finale da **2,5kg** per prodotti in granella e **500g** per prodotti processati





La partita viene considerata non conforme quando almeno uno campione analitico è positivo



Improved sensitivity by subsampling



Dietrich Mäde, April 2009

Un seme di riso su
10 000 (240g)



0,01%

Analisi di 4 campioni
da 10 000



0,002%



Allegato 8

LINEE GUIDA SUL CAMPIONAMENTO PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEI MANGIMI

CReAA
Dr. Carlo Brera
ISS Dr. Stacchini Dr.ssa Civitareale
CROGM
CRN Radioattività
CRN Diossine
CRN Salmonella
Uff. VIII DGSAF

Aggiornato in base al Regolamento (UE) 691/2013



Allegato 8 PNAA

9. ISTRUZIONI SPECIFICHE PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER L'ANALISI DELLE MICOTOSSINE E DEGLI OGM IN MATERIE PRIME IN GRANELLA

Il CG è opportunamente sigillato e munito di cartellino identificativo recante le informazioni necessarie ad individuare la partita a cui il campione appartiene. Ciascun CG deve successivamente essere omogeneizzato con apposito strumento adeguatamente pulito mediante opportuna (per tempo e portata) mescolatura. **CGO (pag 21 del piano)**

Il CGO è successivamente consegnato dagli organi ufficiali preposti al campionamento al laboratorio di analisi per l'espletamento della successiva fase relativa alla formazione dei campioni finali.

Il CGO deve necessariamente essere accompagnato da un verbale di prelevamento recante tutte le informazioni, rese in modo leggibile, necessarie ad identificare sia la partita di riferimento sia le modalità di campionamento effettuate (Allegato 1/1a e 1b del PNAA 2012/2014).

9.2 Formazione del campione ridotto

Se necessario il CGO può essere "ridotto" ad un peso di 2 Kg così come indicato dal Regolamento. **In caso di riduzione, è richiesta la macinazione del CGO prima della formazione del campione ridotto.**



Allegato 8 PNAA

9. ISTRUZIONI SPECIFICHE PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER L'ANALISI DELLE MICOTOSSINE E DEGLI OGM IN MATERIE PRIME IN GRANELLA

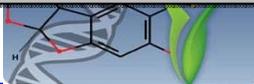
9.3 Formazione dei campioni finali

Al fine di garantire una distribuzione uniforme dell'analita nei CF, si deve necessariamente ricorrere **alla macinazione del CGO**.

I CF sono ottenuti dalla macinazione del CG, o dal campione ridotto (parte del campione globale macinato), con apposita apparecchiatura o da banco o industriale.

Le operazioni di macinazione del CG, devono essere effettuate da personale adeguatamente formato, con attrezzature idonee, presso locali con adeguati requisiti strutturali appositamente individuati dalle Autorità regionali.

Ai fini di una uniforme applicazione del PNAA, il Ministero raccomanda che le Autorità Regionali individuino **gli IZS come sedi idonee** in cui effettuare l'attività di macinazione del campione globale, per l'ottenimento dei CF.



Allegato 8 PNAA

9. ISTRUZIONI SPECIFICHE PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER L'ANALISI DELLE MICOTOSSINE E DEGLI OGM IN MATERIE PRIME IN GRANELLA

9.4 Delega

Le Autorità sanitarie che hanno prelevato il campione potranno delegare altre Autorità locali (colleghi della stessa amministrazione di appartenenza (PIF-ASL) con sede più vicina al laboratorio che dovrà effettuare le analisi.

Alla formazione dei campioni finali, potrà essere presente, anche il titolare dell'azienda o il proprietario/detentore del mangime, presente alla formazione del CG o altro delegato. A tal fine è necessario che siano convocate le parti interessate nei tempi previsti per legge.

Il titolare dell'azienda o il proprietario/detentore del mangime, nel caso in cui non abbia intenzione di essere presente alla formazione dei CF presso la sede in cui avverrà la formazione dei CF o degli IZZSS, potrà comunicarlo per iscritto alle Autorità interessate (che hanno effettuato il prelievo e la preparazione del CG.).

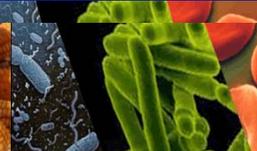


Allegato 8 PNAA

9. ISTRUZIONI SPECIFICHE PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER L'ANALISI DELLE MICOTOSSINE E DEGLI OGM IN MATERIE PRIME IN GRANELLA

9.5 Strumentazione

- ✓ Per le micotossine è raccomandata la tecnica dello slurry
- ✓ Per gli OGM, la macinazione deve essere effettuata a secco evitando un eccessivo riscaldamento del campione che potrebbe determinare una degradazione del DNA. Inoltre è consigliabile ottenere una granulometria non superiore agli 0,5 mm per la soia e 0,75 mm per il mais.



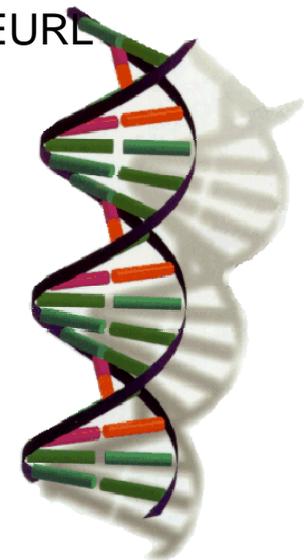
LINEE GUIDA SUL CAMPIONAMENTO PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI ALIMENTI PER GLI ANIMALI PER L'ATTUAZIONE DEL PNAAL ALLEGATO 8

OGM regolamento (UE) n. 619/2011 - Low Level Presence

Fissa i metodi di campionamento e di analisi per i controlli ufficiali dei mangimi per la presenza di OGM in corso una procedura di autorizzazione o la cui autorizzazione sia scaduta.

- OGM autorizzati in un paese terzo e per il quale è stata presentata nell'UE una domanda di autorizzazione e la cui procedura di autorizzazione sia durata più di 3 mesi, purché:
 - non sia stato classificato dall'EFSA come nocivo per la salute o per l'ambiente;
 - il metodo analitico quantitativo sia stato validato e pubblicato dall'EURL
 - sia disponibile il materiale di riferimento certificato

- OGM precedentemente autorizzati, la cui autorizzazione sia scaduta



LINEE GUIDA SUL CAMPIONAMENTO PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI ALIMENTI PER GLI ANIMALI PER L'ATTUAZIONE DEL PNAAL ALLEGATO 8

OGM regolamento (UE) n. 619/2011

9.1 Formazione del campione globale (CG)

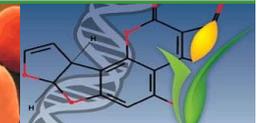
Campionamento per l'analisi di OGM nelle materie prime in granello deve essere in grado di consentire la valutazione della concentrazione dei semi GM rispetto ai semi Non-GM a differenza di altri analiti (proteine fibra umidità o contaminanti) per cui è necessario valutare il valore medio della loro concentrazione nella partita.

Risultato $< 0,1\%$ \Rightarrow campione conforme

Risultato $\geq 0,1\%$ \Rightarrow **campione non conforme**



0,01% corrisponde a 1 seme GM/10.000



LINEE GUIDA SUL CAMPIONAMENTO PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEGLI ALIMENTI PER GLI ANIMALI PER L'ATTUAZIONE DEL PNAAL ALLEGATO 8

OGM

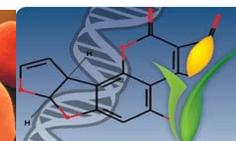
9.1 Formazione del campione globale (CG)

Per la verifica della presenza di materiale geneticamente modificato nel quadro del **regolamento (UE) n. 619/2011**, il campione globale/ridotto deve essere tale da permettere di ottenere campioni finali di almeno 10 000 semi/grani, pertanto la dimensione del campione globale non deve essere inferiore al peso corrispondente a 35000 semi/semi.

Tuttavia, essendo almeno **4 i campioni finali** previsti dalla normativa nazionale, il campione globale deve essere costituito da almeno **40000 semi**.



Specie vegetale	Campione finale in gr (corrispondente a 10000 semi)	Campione globale minimo in kg per i controlli sul territorio nazionale 5 CF	Campione globale minimo in kg per i controlli all'importazione 3 CF
Orzo, miglio, avena, riso, segale, frumento	400	4	4
Granturco	3000	12	9
Soia	2000	8	6
Semi di colza	40	4	4



Grazie per l'attenzione

