



***OGM: problematica, campionamento e risvolti analitici***

Analisi ed interpretazione del dato

Antonia Anna Lettini

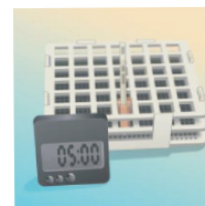
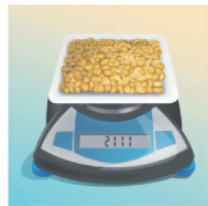
La ricerca di OGM può essere effettuata tramite due approcci metodologici:

**1. Ricerca di proteine**



**AGRASTRIP™ OGM Trait**

Test per la determinazione qualitativa di proteine OGM nella granella e nelle foglie



## 2. Ricerca di geni specifici nel DNA della matrice da analizzare



**GMO SCREENING KIT**  
Real Time

**4LAB**  
Diagnostics

Real Time PCR *GMO* Detection Kit

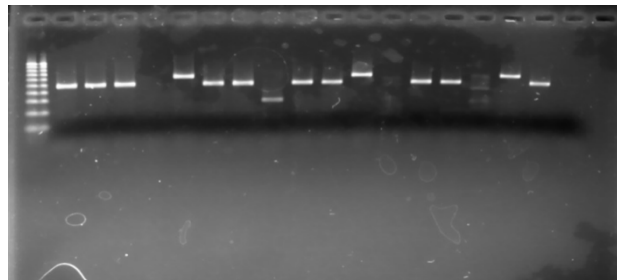
Real time PCR *GMO* Detection Kit with amplification control

## **2. Ricerca di geni specifici nel DNA della matrice da analizzare**

metodi in-house

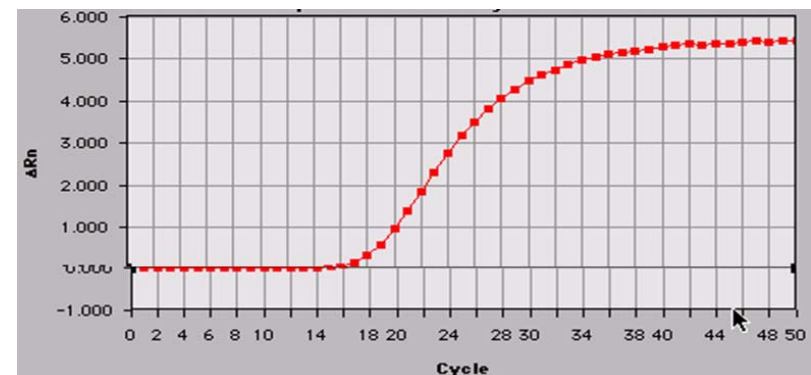
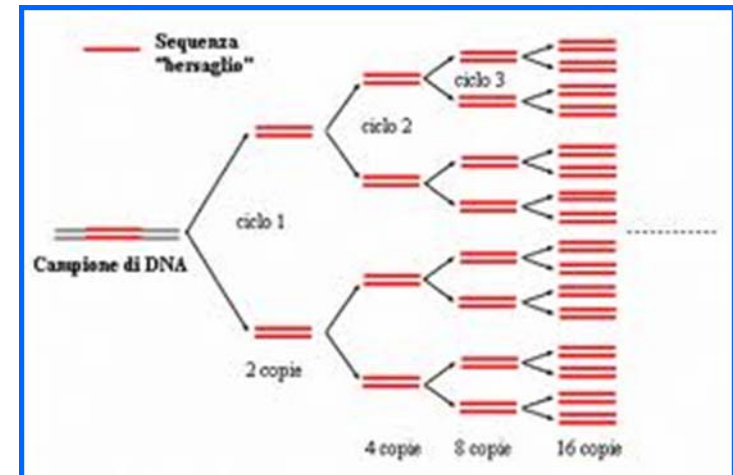
Principio è uguale: amplificazione  
di una regione genica specifica e rilevazione di tale amplificato

o tramite elettroforesi in gel d'agarosio (primers specifici

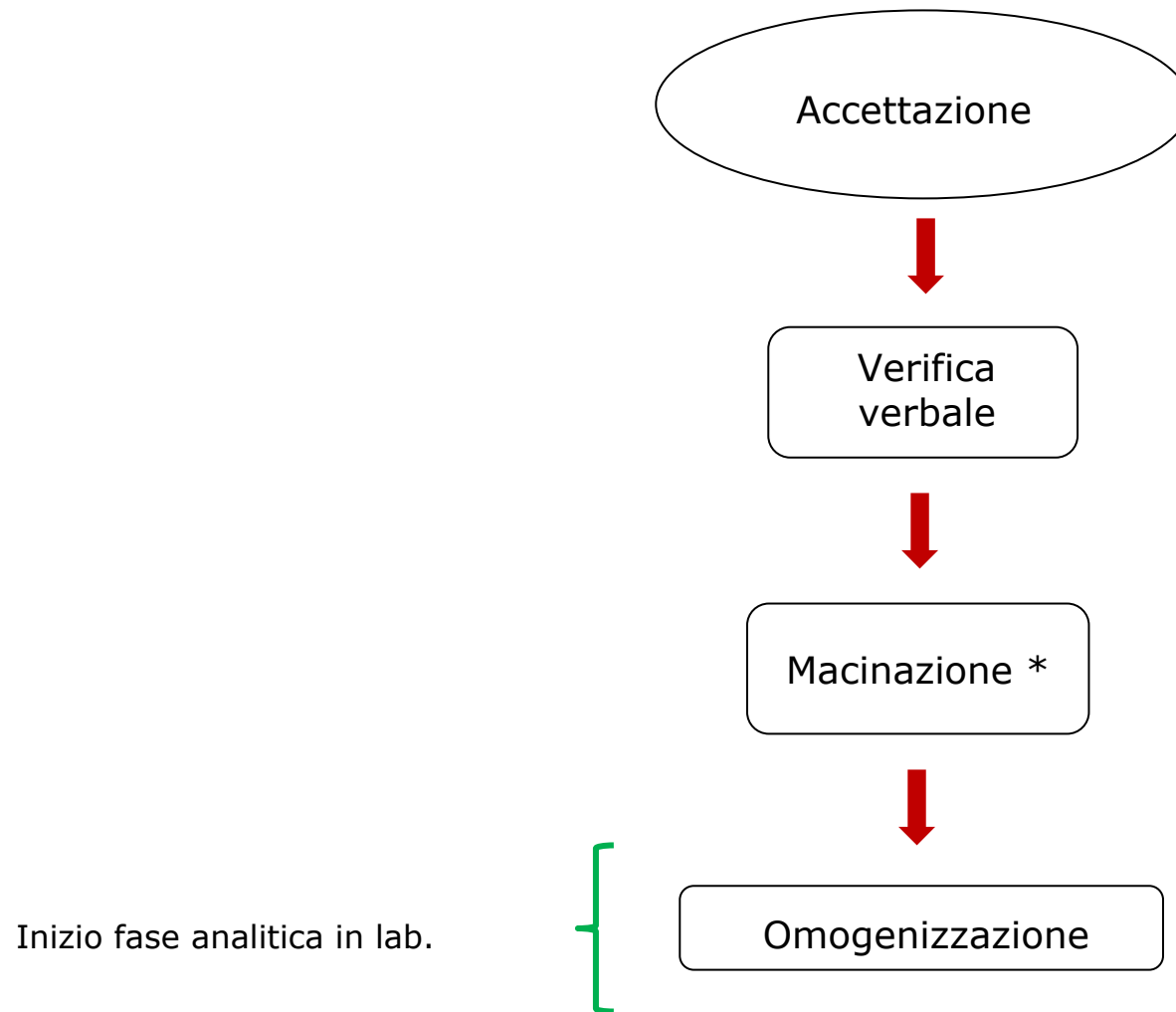


oppure

tramite metodo real time PCR  
(primers e sonde specifici)

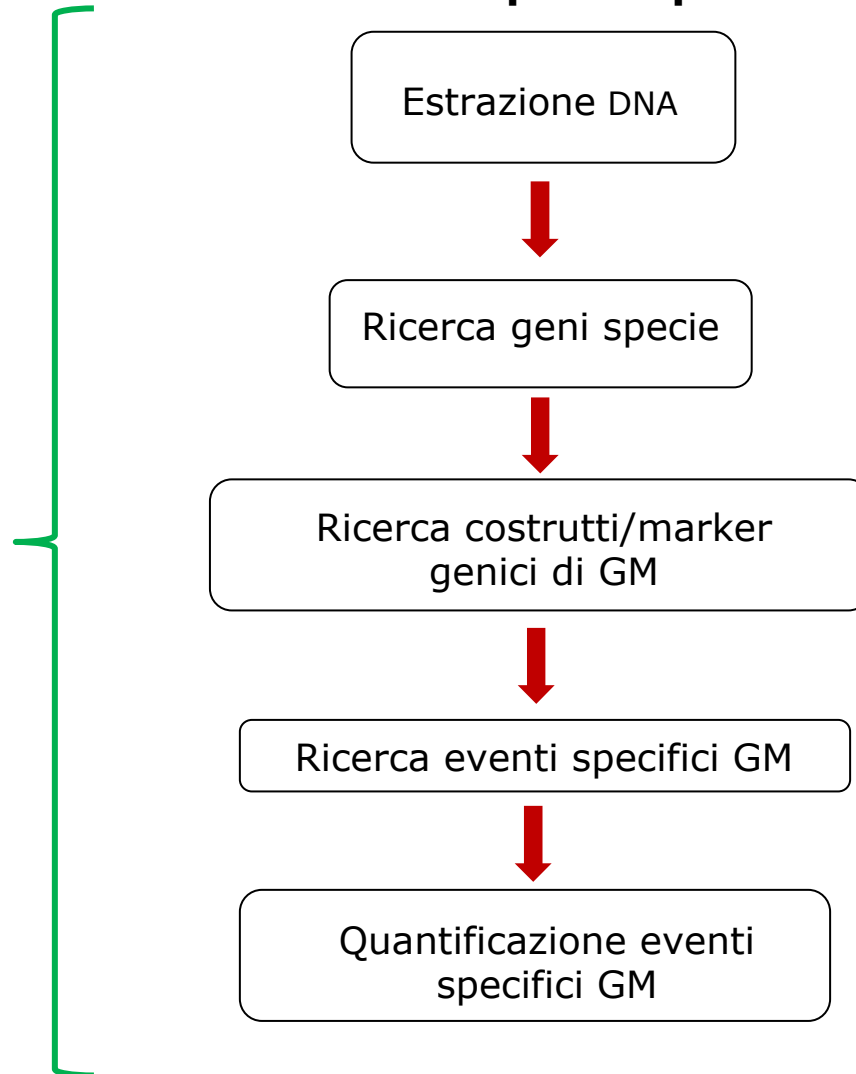


## Flusso analitico del campione per ricerca di OGM



## Flusso analitico del campione per ricerca di OGM

Successive  
fasi analitiche in lab.



Come descritto nei PIANI NAZIONALI, le matrici oggetto di campionamento per ricerca OGM hanno essenzialmente una distribuzione NON OMOGENEA

Tipologia di distribuzione A: analiti distribuiti in modo uniforme	Tipologia di distribuzione B: analiti distribuiti in modo <u>non</u> <u>uniforme</u>
Principi farmacologicamente attivi e additivi	Principi farmacologicamente attivi e additivi (contaminazione crociata / carry over)
Radionuclidi	Costituenti origine animale vietati
Metalli Pesanti (arsenico, piombo, mercurio, cadmio)	Micotossine
Altre sostanze indesiderabili (nitriti, melamina)	<u>OGM</u>
Diossine - PCB Diossina - simili - PCB non Diossina Simili	Sostanze indesiderabili (di cui alla direttiva 2002/32/CE, allegato I sezioni III e IV)
Pesticidi	<i>Salmonella</i> spp.



.....É importante precisare che la maggior parte degli analiti distribuiti in modo non uniforme nelle materie prime possono però essere distribuiti in modo **uniforme nei mangimi composti** a seguito dell'attività di miscelazione che comporta una uniformità nella distribuzione degli analiti attraverso l'intera massa del mangime.....

Da Allegato 8,  
Ministero della Salute PNAA 2015/2017



Matrici oggetto di campionamento possono essere suddivise in **due CATEGORIE** principali

Foodex	Principali gruppi alimentari	Esempi	codici TARIC	Distribuzione omogenea di OGM nel prodotto	Distribuzione non omogenea di OGM nel prodotto	
					Prodotti che richiedono macinazione + omogeneizzazione	Prodotti che richiedono 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)	
	Pasta, noodles,	riso; vermicelli, gnocchi, ecc. di mais e riso	1006 Riso	vermicelli, gnocchi, ecc. di mais e riso	<u>riso</u>	

Queste matrici/alimenti necessitano di essere macinate (esclusivamente a secco) prima della formazione delle aliquote

Es. riso

Disponibilità di un mulino per i prelevatori (\*IZSVe)



Matrici oggetto di campionamento possono essere suddivise in **due CATEGORIE** principali

Foodex	Principali gruppi alimentari	Esempi	codici TARIC	Distribuzione omogenea di OGM nel prodotto	Distribuzione non omogenea di OGM nel prodotto	
					Prodotti che richiedono macinazione + omogeneizzazione	Prodotti che richiedono omogeneizzazione
A17	Prodotti per lattanti e bambini	Latte vegetale liquido o in polvere, alimenti a base di cereali, biscotti, pasta, omogeneizzati	1901 10 00 Preparazioni per l'alimentazione dei bambini, condizionate per la vendita al minuto (a base di cereali); 2005 10 00 Ortaggi	<u>Latte vegetale liquido o in polvere, alimenti a base di cereali, biscotti, pasta, omogeneizzati</u>		

## Specie vegetali



Mais

Soia



Riso

Lino



Barbabetola da zucchero

\* patata

\* cotone

\* colza

IZSve

CROGM – IZSLT

a) *Miscelazione manuale o meccanica*

Il campione deve essere miscelato il più possibile e ciò si ottiene attraverso l'uso di un frullatore a lame o nel caso di materie prime in grani attraverso un mulino



b) *Formazione del campione analitico*

250 g di campione da macinare



c) *Pesata del campione*

2 g (5 g per riso e mangimi)

0.2 g  $\pm$  0,03

d) *Estrazione del DNA* in duplicato per ciascun campione

in quadruplicato \*

A



B





Legnaro, 1 Luglio 2015

Ricerca dei geni che identificano la specie botanica:

**GENE LECTINA** per la specie *Glycine max*  
(rilevazione DNA di soia)

**GENE HMG** high mobility group, per la specie *Zea mays*  
(rilevazione DNA di mais)

**GENE GS** Glutamina sintetasi, per la specie *Beta vulgaris*  
(rilevazione DNA di Barbabietola da zucchero)

**GENE PLD** Fosfolipasi D per la specie *Oryza sativa*  
(rilevazione DNA di riso)

**GENE SAD** Stearoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase2  
per la specie *Linum usitatissimum* (rilevazione DNA di lino)

IZSve

«**CROGM N-RL IZSLT  
POS VIR 031 INT.  
Rev. 2 2012**»

- Ogni estratto viene amplificato in duplicato  
(4 replicati per ogni campione per ogni target genico)

Esito Positivo



Esito Negativo



In corrispondenza della dichiarata presenza di una specie vegetale, un esito NEGATIVO è segnale di un problema intrinsecamente legato alla matrice che non consente l'estrazione del DNA o alla presenza di inibitori di PCR nell'estratto di DNA

PIANO NAZIONALE ALIMENTAZIONE ANIMALE / CAMPIONE UFFICIALE		
MATERIALE ESAMINATO: 1 campione (1 unità campionaria)		Identificazione: 1 - (CONV) MANGIME COMPLEMENTARE - PRODOTTO FINITO
Tipo di materiale MANGIME ((SPECIE ANIMALE NON ATTRIBUIBILE))		
ANALISI (Metodo)	Sottoanalisi	Risultato
ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): GS (CONTROLLO DNA BARBABIETOLA AMPLIFICABILE) (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 092 2011 Rev. 2)		Assenza DNA DI BARBABIETOLA
ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): HMG (CONTROLLO DNA MAIS AMPLIFICABILE) (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 062 2011 Rev. 4)		PRESENZA DNA DI MAIS
ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): LECTINA (CONTROLLO DNA SOIA AMPLIFICABILE) (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 063 2011 Rev. 4)		PRESENZA DNA DI SOIA



## Ricerca «marker» di GM (promotori, terminatori etc..)

Promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV)

Terminatore NOS del gene nopalina sintasi di *Agrobacterium tumefaciens*

Gene PAT: gene fosfotricin acetiltransferasi di *Streptomyces viridochromogenes*

Gene NPTII: gene per neomicin fosfotransferasi II di *Escherichia coli*

Gene CP4-EPSPS: derivato dal ceppo CP4 di *Agrobacterium tumefaciens*

Costrutto CTP-CP4-EPSPS: derivato dalla congiunzione della sequenza codificante per CTP da *Arabidopsis thaliana* e la sequenza EPSPS dal ceppo CP4 di *Agrobacterium tumefaciens*

**Costrutto CTP2-CP4-EPSPS**

**Gene BAR (Phosphinothricin N-acetyltrasferase)**

IZSve

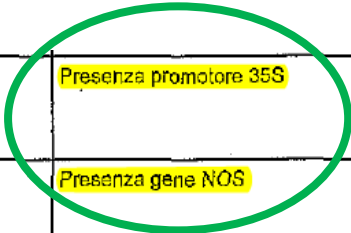
«CROGM N-  
RL IZSLT POS  
VIR 032 INT.  
Rev. 2 2013»

CROGM – IZSLT

Esito positivo  
ovvero presenza di alcuni di questi  
«marker»



<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): PROMOTORE 35 S</b> <small>(REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 070 2011 Rev. 4)</small>		<b>Presenza promotore 35S</b>
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DEL GENE NOS</b> <small>(REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 176 2013 Rev. 0)</small>		<b>Presenza gene NOS</b>
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DEL GENE NPTII</b> <small>(REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 175 2013 Rev. 0)</small>		<b>Assenza gene NPT II</b>
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DEL GENE PAT</b> <small>(REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 174 2013 Rev. 0)</small>		<b>Assenza gene PAT</b>
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE</b>		<b>Presenza gene CP4-EPSPS</b>





### Esito negativo


La negatività per i marker/costrutti investigati non necessariamente consente di escludere la presenza di GM

.....



<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): PROMOTORE 35 S</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 070 2011 Rev. 4)		Presenza promotore 35S
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DEL GENE NOS</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 176 2013 Rev. 0)		Presenza gene NOS
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DEL GENE NPTII</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 175 2013 Rev. 0)		Assenza gene NPT II
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DEL GENE PAT</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 174 2013 Rev. 0)		Assenza gene PAT
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE</b>		Presenza gene CP4-EPSPS



Specie vegetale 	Evento GM	ELEMENTO DI SCREENING													
		COSTRUTTO CTP-EPSPS (3 METODI):												BAR	
		p35S	Tnos		NPTII		PAT		ec	CP4-EPSPS (no, -)	CTP-CP4EPSPS (no, -)	CTP2-CP4EPSPS (no, -)	ATTESO	VERIFI CATO	
ATTESO	VERIFI CATO	ATTESO	VERIFI CATO	ATTESO	VERIFI CATO	ATTESO	VERIFI CATO	ATTESO**	VERIFICA TO	VERIFICA TO	VERIFICA TO	ATTESO	VERIFI CATO		
cotone	MON1445 <sup>7</sup>	P	+	P	+	P	+	A	-	P	-	+	+ <sup>3</sup>	A	- <sup>4</sup>
cotone	MON15985 <sup>8</sup>	P	+	P	+	P	+	A	-	A	-	-	-	A	- <sup>4</sup>
cotone	MON531 <sup>7</sup>	P	+	P	+	P	+	A	-	A	-	-	-	A	- <sup>4</sup>
cotone	LL25	P	+	P	+	A	-	A	-	A	-	-	-	P	+ <sup>3;4</sup>
cotone	GHB614	A	-	A	-	A	-	A	-	A	-	-	-	A	-
cotone	3006-210-23 x 281-24-236	A	-	A	-	A	-	P	+	A	-	-	-	A	- <sup>4</sup>
cotone	MON88913 <sup>8</sup>	P <sup>1</sup>	+	A	-	A <sup>2</sup>	+	A	-	P	-	+	+ <sup>3</sup>	A	- <sup>3</sup>
cotone	GHB119	P	+	P	+	A	-	A	-	A	-	-	-	P	+ <sup>3</sup>
cotone	T304-40	P	+	P	+	A	-	A	-	A	-	-	-	P	+ <sup>3</sup>
mais	Bt 11	P	+	P	+	A	-	P	+	A	-	-	-	A	- <sup>4</sup>
mais	DAS1507	P	+	A	-	A	-	P	+	A	-	-	- <sup>3;4</sup>	A	- <sup>4</sup>
mais	DAS59122	P	+	A	-	A	-	P	+	A	-	-	- <sup>4</sup>	A	- <sup>4</sup>
mais	GA21	A	-	P	+	A	-	A	-	A	-	-	- <sup>3;4</sup>	A	- <sup>4</sup>
mais	MIR162	A	-	P	+	A	-	A	-	A	-	-	- <sup>3</sup>	A	-
mais	MIR604	A	-	P	+	A	-	A	-	A	-	-	- <sup>3</sup>	A	- <sup>4</sup>
mais	MON810	P	+	A	-	A	-	A	-	A	-	-	- <sup>3;4</sup>	A	- <sup>4</sup>
mais	MON863	P	+	P	+	P	+	A	-	A	-	-	-	A	- <sup>4</sup>
mais	MON88017	P	+	P	+	A	-	A	-	P	+	-	+ <sup>3;4</sup>	A	- <sup>4</sup>
mais	NK603	P	+	P	+	A	-	A	-	P	+	-	+ <sup>3;4</sup>	A	- <sup>4</sup>
mais	T25	P	+	A	-	A	-	P	+	A	-	-	- <sup>4</sup>	A	- <sup>4</sup>
mais	MON89034	P	+	P	+	A	-	A	-	A	-	-	-	A	-
mais	3272	A	-	P	+	A	-	A	-	A	-	-	- <sup>4</sup>	A	- <sup>3;4</sup>
mais	98140	P	+	A	-	A	-	A	-	A	-	-	-	A	-
mais	DAS40278-9	A	-	A	-	A	-	A	-	A	-	-	-	A	- <sup>3</sup>
mais	MON87460	P	+	P	+	P	+	A	-	A	-	-	-	A	-
mais	Bt 176 (b) <sup>6</sup>	P	+	A	-	A	-	A	-	A	-	-	- <sup>4</sup>	P	+ <sup>3;4</sup>
mais	LY038	A	-	A	-	A	-	A	-	A	-	-	- <sup>3</sup>	A	- <sup>3</sup>
mais	DAS59132-8 (Event 32 or E-32)	P	+	A	-	A	-	P	+	A	-	-	-	A	-
colza	MS8/RF3	A	-	P	+	A	-	A	-	A	-	-	- <sup>4</sup>	P	+ <sup>3;4</sup>

## Ricerca degli eventi GM specifici

BAT 64: MON 810 (mais)

BAT 65: BT 11 (mais)

BAT 69: RRS (soia 40-3-2)

BAT 91: LL601-LL62 (riso)

BAT 95: H7-1 (barbabietola)

BAT 158: FP967 (lino)



IZSve

Metodi interni

Tali procedure sono accreditate, e sono basate su metodi *in-house*,  
DIVERSI (\*) da quelli validati dal CROGM



## Ricerca degli eventi GM specifici

<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): TRANSGENE MON-810</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 064 2011 Rev. 4)		Non rilevato DNA di mais MON810
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): TRANSGENE BT11</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 065 2011 Rev. 4)		Non rilevato DNA di mais BT11
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): TRANSGENE RRS</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 069 2011 Rev. 4)		Rilevato DNA di sola RRS



Legnaro, 1 Luglio 2015

**PIANO NAZIONALE ALIMENTAZIONE ANIMALE / MONITORAGGIO**

<b>MATERIALE ESAMINATO: 1 campione (1 unità campionaria)</b>		<b>Identificazione: 1 - MAIS MACINATO</b>
<b>Tipo di materiale MATERIA PRIMA VEGETALE -MAIS (MAIS)</b>		
<b>ANALISI (Metodo)</b>	<b>Sottoanalisi</b>	<b>Risultato</b>
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): HMG (CONTROLLO DNA MAIS AMPLIFICABILE)</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 062 2011 Rev. 4)		PRESENZA DNA DI MAIS
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): PROMOTORE 35 S</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 070 2011 Rev. 4)		Presenza promotore 35S
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DEL GENE NPTII</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 175 2013 Rev. 0)		Assenza gene NPT II
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DEL GENE PAT</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 174 2013 Rev. 0)		Assenza gene PAT
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): IDENTIFICAZIONE DELLA PRESENZA DEL GENE CP4-EPSPS</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 177 2013 Rev. 0)		Presenza gene CP4-EPSPS
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): TRANSGENE BT11</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 065 2011 Rev. 4)		Non rilevato DNA di mais BT11
<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): TRANSGENE MON-810</b> (REAL TIME PCR QUALITATIVA / PDP BAT 064 2011 Rev. 4)		Non rilevato DNA di mais MON810



Legnaro, 1 Luglio 2015

## Quantificazione dell'evento GM specifico individuato

BAT 69 Q: RRS (soia)

Il metodo che utilizziamo è la  
Quantificazione Relativa è basato sulla valutazione del  $\Delta Ct$ :

Ct dell' evento transgenico che si sta cercando  
(es. RRS Round up Ready Soy evento MON 40-3-2)

VS

Il Ct del gene specifico di specie (es. Lectina)

Per fare questo si costruisce una curva standard utilizzando  
Materiale certificato (CRM) a concentrazione nota di materiale GM

Tale procedura è accreditata, ed è basata su un metodo *in-house*,  
DIVERSO (\*) da quello validato dal CROGM



## Se si tratta di OGM autorizzati

> 0.9% dichiarato in etichetta: **CAMPIONE CONFORME**

< 0.9% NON dichiarato in etichetta: **CAMPIONE CONFORME**

> 0.9% NON dichiarato in etichetta: **CAMPIONE NON CONFORME**

## Se si tratta di OGM non autorizzati

< 0.1%: **CAMPIONE CONFORME**

≥ 0.1 % **CAMPIONE NON CONFORME**

<b>ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI (OGM): TRANSGENE RRS</b> (REAL TIME PCR QUANTITATIVA / PDP BAT 069 2011 Rev. 4)		Valore riscontrato: < 0,1 %
---	--	-----------------------------



Legnaro, 1 Luglio 2015

## Eventi noti (aggiornamento CROGM Workshop maggio 2015)

- a)Mais [19 eventi]
- b)Soia [15 eventi]
- c)Cotone [10 eventi]
- d)Colza [8 eventi]
- e)Barbabietola da zucchero [1 evento]
- f)Patata [1 evento]
- g)Lino [1 evento]
- h)Riso [3 eventi]

....**luglio 2015** oltre **70 eventi** Geneticamente modificati

**NOTA:**

**Tutti i campioni dovranno contenere almeno una delle seguenti specie vegetali: soia, mais, cotone, colza, barbabietola da zucchero, patata, riso, lino.**

**Per la ricerca di OGM autorizzati, nell'ambito del circuito convenzionale, dovranno essere prelevati solo i campioni che, rispetto ad almeno una delle specie vegetali sopra menzionate, non riportano in etichetta la presenza di materiale geneticamente modificato.**

**Nel caso in cui una o più specie fossero dichiarate geneticamente modificate si può procedere all'analisi di altre specie vegetali non indicate in etichetta come GM.**

**Al verbale di campionamento deve essere allegata l'etichetta o documento commerciale del mangime, pena respingimento del campione da parte del laboratorio accettante.**

Per ciò che concerne la ricerca degli OGM non autorizzati si può procedere alla ricerca degli eventi ricadenti nel Regolamento (UE) 619/2011 (per ricerca di OGM per i quali sia in corso una procedura di autorizzazione o la cui autorizzazione sia scaduta). E' possibile verificare lo stato delle autorizzazioni nell'Unione Europea sul registro ufficiale pubblicato presso il seguente sito web: [http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm).





Grazie per l'attenzione

*alettini@izsvenezie.it*

## Diapositiva 25

---

**LAA6**

[http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2\\_6.jsp?lingua=italiano&id=1545&area=sanitaAnimale&menu=mangimi](http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=1545&area=sanitaAnimale&menu=mangimi)

Lettini Antonia Anna; 29/06/2015