

Impiego di materiali di riferimento certificati per la quantificazione degli OGM negli alimenti e nei mangimi

La presente nota di applicazione fornisce orientamenti per l'uso corretto dei materiali di riferimento certificati dall'IRMM per la rispettiva frazione di massa GM (geneticamente modificata) di un evento specifico di modificazione genetica.

Le informazioni riportate qui di seguito si riferiscono in particolare all'impiego dei seguenti materiali di riferimento certificati ERM-BF410, ERM-BF411, ERM-BF412, ERM-BF413, ERM-BF414, ERM-BF415, ERM-BF416, ERM-BF417, ERM-418 e ERM-BF423.

Autore: Stefanie Trapmann

Commissione europea – Centro comune di ricerca

Istituto dei materiali e misure di riferimento (IRMM)

Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgio

Email: stefanie.trapmann@ec.europa.eu

www.erm-crm.org

INTRODUZIONE

Il regolamento (CE) n. 1830/2003 istituisce norme particolari di etichettatura per gli alimenti e i mangimi aventi un contenuto di organismi geneticamente modificati (OGM) superiore allo 0,9 %, purché immessi in commercio in Europa in conformità alla legislazione/direttiva comunitario/a. Occorre pertanto determinare il tenore di tali organismi nei prodotti mediante procedure affidabili. Appropriati materiali di riferimento certificati (CRM) rappresentano uno strumento indispensabile per garantire la qualità dei risultati.

CARATTERISTICHE DEI CRM PER OGM

I valori certificati dei CRM figuranti nell'elenco in alto si basano su masse di polveri di semi anidre OGM e non OGM utilizzati nella preparazione gravimetrica. Le masse sono corrette in funzione del contenuto d'acqua e della purezza stimata. La frazione di massa geneticamente modificata (GM) è calcolata in base alla seguente formula:

$$\frac{\text{massa di polvere GM (corretta)}}{\text{massa di polvere GM (corretta)} + \text{massa di polvere non GM (corretta)}}$$

Tutti i CRM per OGM sono certificati per una frazione di massa di un evento specifico di manipolazione genetica (conformemente a quanto indicato nel relativo certificato). Il CRM può quindi essere usato per quantificare unicamente l'evento indicato nel certificato e il materiale puro non-GM per dimostrare l'assenza dell'evento in esame al di sotto della soglia indicata sul certificato.

ERM® - BF418c

DRIED MAIZE POWDER		
	Mass Fraction	
	Certified value ¹⁾ [g / kg]	Uncertainty ²⁾ [g / kg]
1507 maize	9.9	-0.6 ; +0.8

1) The certified value is based on the mass fraction of dried non-genetically modified powder and dried genetically modified powder mixed and corrected for the water content. The certified value is traceable to the SI.

2) The certified uncertainty is the expanded uncertainty estimated in accordance with the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM) with a coverage factor $k = 2$, corresponding to a level of confidence of about 95 %.

Figura 1: Particolare del certificato del CRM per GM ERM-BF418c.

Alcuni CRM per OGM recentemente immessi sul mercato dall'IRMM sono stati certificati con un intervallo

di incertezza asimmetrico. Se si usano tali CRM per accertare eventuali errori sistematici (cfr. nota di applicazione 1 ERM), si deve utilizzare "l'incertezza positiva" qualora il risultato medio della misurazione superi il valore certificato e "l'incertezza negativa" quando il risultato medio della misurazione è inferiore al valore certificato.

IMPIEGO DELLA PCR IN TEMPO REALE

La reazione a catena della polimerasi in tempo reale (rt-PCR) è comunemente usata per quantificare le frazioni geneticamente modificate nei campioni di alimenti e mangimi. Questa tecnica di quantificazione basata sul DNA misura il rapporto tra l'acido desossiribonucleico (DNA) transgenico, ossia derivato da modificazioni genetiche, e il DNA endogeno, che è specifico delle specie biologiche.

A causa della diversa composizione genetica delle varie parti dei semi di monocotiledoni (ad es. endosperma, esosperma e embrioni del mais), è possibile che il valore del rapporto di DNA nel materiale di riferimento non coincida con quello della frazione di massa di polvere certificata. Di conseguenza, il rapporto tra DNA transgenico estraibile e DNA endogeno estratto non è necessariamente uguale al rapporto tra la massa di mais geneticamente modificato e la massa totale di mais, anche se le due specie di DNA presentano rese di estrazione analoghe.

Nel preparare i CRM per OGM ci si è preoccupati in particolare modo di far sì che le polveri geneticamente modificate (GM) e quelle non

GM fossero simili sotto il profilo della granulometria. Si tratta di un aspetto particolarmente importante per quanto riguarda la quantità di DNA estraibile da entrambe le polveri. Una differenza sotto il profilo dell'efficienza di estrazione del DNA dalle polveri GM e non-GM si ripercuoterebbe sui valori di concentrazione GM misurati mediante rt-PCR. Si dovrebbero pertanto usare unicamente metodi convalidati rispondenti a questo criterio.

Nell'ambito della certificazione la frazione di massa GM del CRM è verificata con un metodo rt-PCR specifico per l'evento considerato. Tuttavia è necessaria una certa cautela prima di formulare conclusioni quantitative sulla base di misurazioni effettuate con campioni non noti, poiché la quantificazione GM sulla base del DNA può essere diversa a seconda della varietà particolare sottoposta al test. Se non reperibile altrove, si consiglia

di analizzare l'impatto delle diverse varietà sui risultati rt-PCR mediante validazione interna [1].

I metodi di rilevamento PCR in tempo reale presentati e convalidati a norma del regolamento (CE) n. 1829/2003 possono essere reperiti consultando il sito internet del Laboratorio di riferimento comunitario per gli alimenti e i mangimi geneticamente modificati, al seguente indirizzo:

(<http://gmo-crl.jrc.it/detectionmethods.htm>).

ESPRIMERE I RISULTATI IN NUMERI RELATIVI DI COPIE DI DNA

In Europa la metodologia più spesso usata per la quantificazione degli OGM è la rt-PCR; per tale motivo la raccomandazione (2004/787/CE) recentemente approvata dalla Commissione propone di esprimere i risultati delle analisi dei campioni geneticamente manipolati in numero di copie di DNA. Se si usano CRM certificati di OGM per la frazione di massa geneticamente modificata ai fini della calibrazione delle misurazioni e si esprime il risultato finale in numero di copie relative, si dovrebbe tenere presente che i CRM sono stati prodotti usando mais GMO eterozigotico per il transgene. Informazioni sulla zigosità dei semi usati

per la produzione dei CRM sono fornite nel relativo rapporto di certificazione. Si deve inoltre considerare che nel caso del mais il numero relativo di copie di GM è influenzato dalle modalità di produzione della varietà ibrida di OGM, nonché dallo stato di endoreduplicazione dei semi, che accresce l'effetto della distribuzione genomica presente nel tessuto dell'endosperma. Se si considerano i casi estremi il numero relativo di copie di GM può essere pari al 33 % (evento transgenico originato dal padre utilizzato per incrociare il seme eterozigota) o al 66 % (evento transgenico originato dalla pianta madre utilizzata per incrociare il seme eterozigota) ipotizzando che l'endoreduplicazione sia talmente intensa che l'impatto dell'endosperma sia pari quasi al 100 %. Tutti gli altri casi (minore impatto dell'endoreduplicazione e maggiore incidenza del tessuto embrionale) risulteranno in valori compresi tra il 33 e il 66 per cento, presupponendo che rispetto a questi effetti, l'impatto dell'esosperma sia trascurabile.

Si riporta qui di seguito un esempio della trasformazione di un risultato di misurazione e della relativa incertezza ottenuto in g/kg in numeri di copie relative.

ESEMPIO

Utilizzando per la calibrazione CRM certificati per la frazione di massa geneticamente modificata, si è riscontrato che un campione di mais conteneva 65 ± 20 g/kg di mais evento 1507. L'incertezza estesa della misurazione di 20 g/kg è stata calcolata utilizzando un fattore 2 di copertura e un'incertezza di misurazione del metodo di quantificazione del 15%, stimato nel corso della validazione interna. Per trasformare il risultato ottenuto per la frazione di massa GM in rapporto di numero di copie, occorre trasformare in valore percentuale il risultato espresso in g/kg dividendolo per 10. Si deve tenere conto del fatto che i CRM OGM del mais utilizzati per la calibrazione sono derivati da semi eterozigoti del mais; i risultati devono pertanto essere divisi per 2:

$$\frac{\bar{x}}{10 \times 2} = \frac{65}{20} = 3,3 \quad \text{dove } \bar{x} = \text{valore medio del contenuto di GM rilevato in g/kg}$$

Si noti che qualora si è osservato un'estraibilità diversa del DNA per i materiali di base non-OGM e OGM utilizzati per produrre i CRM, è necessario introdurre un fattore di correzione. Le informazioni sull'estraibilità del DNA sono fornite nella relazione di certificazione. Usando CTAB si è determinato un rapporto di $0,7 \pm 0,3$ di estraibilità del DNA della polvere OGM diviso per la polvere non-OGM. Di conseguenza, il tenore reale GM del campione analizzato risulta sovrastimato in termini di numeri di copie e deve essere corretto:

$$3,3 * f = 3,3 * 0,7 = 2,3 \quad \text{dove } f = \text{fattore di correzione legato alla diversa estraibilità del DNA delle polveri OGM e non-OGM utilizzate come CRM}$$

L'effetto della endoreduplicazione e della riproduzione dell'evento eterozigote del mais deve essere considerato nell'incertezza dei risultati dell'analisi. L'incertezza deve coprire l'intervallo del 33 % (66 % meno 33%) e il valore misurato può divergere del 16,5 %. Per la stima del rapporto relativo al numero di copie, occorre quantificare il DNA estratto dal campione di mais analizzato e stimare il numero di genomi del mais. Ai fini di questa stima, la concentrazione di DNA è divisa per la dimensione del genoma di mais. Il calcolo dell'incertezza deve pertanto tenere conto dell'incertezza relativa alla quantificazione del DNA e dell'incertezza relativa alla stima della dimensione del genoma. In base alla letteratura, le dimensioni del genoma del mais variano fino al 36 % [2]. Nel corso della convalida interna la riproducibilità del metodo di quantificazione è stata fissata al 22 %. L'incertezza estesa combinata del risultato espresso in rapporti del numero di copie (U_{cc}) può quindi essere calcolata con la seguente formula:

$$U_{cc} = k \sqrt{u_m^2 + u_{gs}^2 + u_{Dq}^2 + u_e^2}$$

$$U_{cc} = 2 \sqrt{15^2 + \left(\frac{18}{\sqrt{3}}\right)^2 + 22^2 + \left(\frac{16,5}{\sqrt{3}}\right)^2} \% = 60\%$$

dove k = fattore di copertura

u_m = contributo dell'incertezza in base al metodo di quantificazione basato sul numero di copie del gene

u_{gs} = contributo dell'incertezza in base alla stima della dimensione del genoma

u_{Dq} = contributo dell'incertezza in base alla quantificazione del DNA

u_e = contributo dell'incertezza in base alla riproduzione e endoreduplicazione

Espresso in numero di copie dei campioni di mais contiene $2,3 \pm 1,4$ sequenze transgeniche dell'evento 1507 per 100 sequenza endogena. Rispetto al risultato espresso in 1507 frazioni di massa di 65 ± 20 g/kg l'incertezza estesa relativa è aumentata dal 30 al 60%.

[1] IUPAC Technical Report (2002): Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis

[2] Poggio et al., Annals of Botany 85 (1998), 107-115.