



Le metodologie di analisi per la determinazione delle PAT: tecniche di laboratorio

Daniela Marchis





FEED BAN

REGOLAMENTO (UE) N. 56/2013 DELLA COMMISSIONE

del 16 gennaio 2013

che modifica gli allegati I e IV del regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili

(Testo rilevante ai fini del SEE)

Reintroduzione delle PAT di non ruminante nell'acquacoltura

PAT insetti

L 138/92

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

25.5.2017

REGOLAMENTO (UE) 2017/893 DELLA COMMISSIONE

del 24 maggio 2017

che modifica gli allegati I e IV del regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio e gli allegati X, XIV e XV del regolamento (UE) n. 142/2011 della Commissione per quanto riguarda le disposizioni in materia di proteine animali

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

Introduzione PAT di insetti in acquacoltura

PAP Table

	Ruminants	Unweaned Ruminants	Non ruminants	Aquaculture	Pets and fur animals
Ruminant PAP (ruminant blood meal included)	NA	NA	NA	NA	A
Non Ruminant PAP	NA	NA	NA	A	A
Non ruminant blood meal	NA	NA	NA	A	A
Insect PAP	NA	NA	NA		
Fish meal	NA	A	A	A	A
Ruminant collagen and gelatine	NA	NA	NA	NA	A
Non ruminant collagen and gelatine	A	A	A	A	A
Ruminant blood products	NA	NA	NA	NA	A
Non ruminant blood products	NA	NA	A	A	A
Hydrolysed proteins from ruminants other than those derived from hides and skins	NA	NA	NA	NA	A
Hydrolysed proteins from non ruminants	A	A	A	A	A
Hydrolysed proteins from ruminants derived from hides and skins	A	A	A	A	A
Di and tricalcium phosphate of animal origin	NA	NA	A	A	A
Milk and milk products	A	A	A	A	A
Colostrum and derivatives	A	A	A	A	A
Eggs and egg products	A	A	A	A	A

NA = not authorised

A = authorised

Verona - 2 Febbraio 2018



EUROPEAN COMMISSION

Brussels,
COM(2010)

The TSE Road map II (*rev.10*)

A Strategy paper on Transmissible Spongiform Encephalopathies for 2010-2015

SCIENTIFIC OPINION

Scientific Opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs)¹

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)^{2, 3}

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy

ABSTRACT

The cattle Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) risk posed by bovine derived Processed Animal Proteins (PAPs) in feed was estimated, the diagnostic methods and their sensitivity to detect animal proteins in feed and compared different risk assessment methods for animal proteins in feed was reviewed. It was concluded that the current global



QRA 2011: Valutazione del ruolo delle proteine animali trasformate in EU per BSE

Stima del quantitativo di dosi infettanti di BSE/anno nei mangimi per bovini europei a partire dalla contaminazione crociata di proteine trasformate ottenute da non ruminanti



Scientific Panel on Biological Hazards

Minutes of the 2nd meeting of the Working Group on "an updated Quantitative Risk Assessment (QRA) of the BSE risk posed by Processed Animal Protein (PAP)"

Physical on 10-11 January 2018

(Agreed on 19 January 2018)¹

Participants

- **Working Group Members:**

Amie Adkin (AA), Matthias Greiner (MG), Daniela Marchis (DM), Marta Prado (MP), Giuseppe Ru (GR), Marion M. Simmons (MMS) (Chair)

- **EFSA:**

BIOCONTAM Unit: Teresa da Silva Felício (TF), Angel Ortiz Pelaez (AOP), Yves van Der Stede (Wednesday 10 January 2018) (BIOCONTAM Unit)

METODI UFFICIALI

REGOLAMENTO (UE) N. 51/2013 DELLA COMMISSIONE

del 16 gennaio 2013

che modifica il regolamento (CE) n. 152/2009 del Consiglio per quanto riguarda i metodi d'analisi per la determinazione dei costituenti di origine animale nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti per animali



Metodo microscopico



Metodo real-time PCR



EURL AP SOPs

This list is updated and contains only valid versions. The binding or optional character of a SOP is indicated. The original version is labelled V.1.0. Minor revisions are labelled V.1.# and major revisions are labelled V.#.0. SOPs recently uploaded are tagged **NEW** for two months after publication date.

<u>Title</u>	<u>Version</u>	
 EURL-AP SOP slide preparation and mounting	V.1.0	BINDING
 EURL-AP SOP use of staining reagents	V.1.0	OPTIONAL
 EURL-AP SOP DNA extraction	V.1.1	BINDING
 EURL-AP SOP operational schemes	V.3.0	BINDING NEW
 EURL-AP SOP Ruminant PCR	V.1.1	BINDING
 EURL-AP File for cut-off determination exact copy number + copies cut-off	V.2.0	BINDING



Schema operativo 1

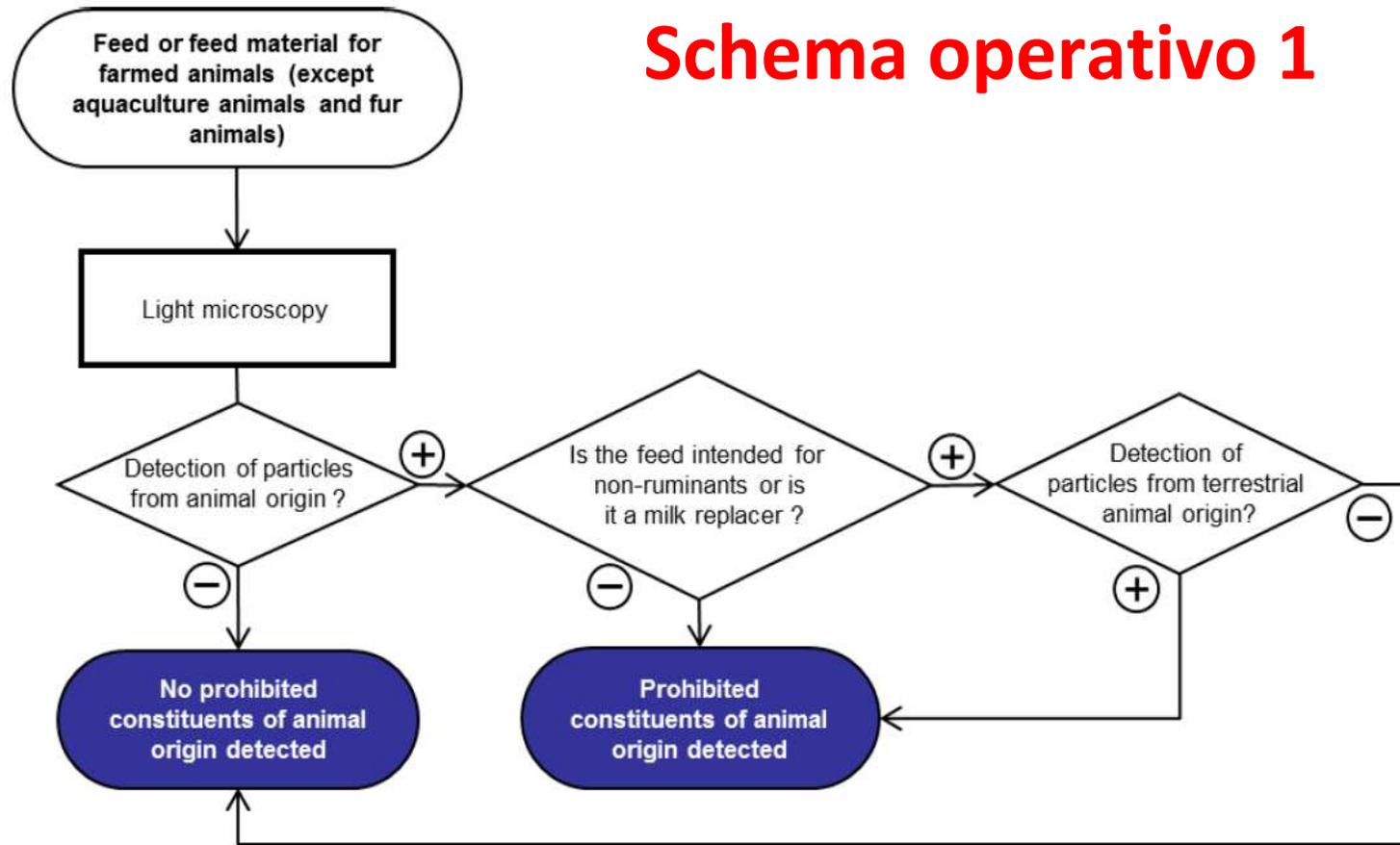


Figure 1. Operational protocol for the analysis of feed or feed material intended for farmed animals other than aquaculture animals and fur animals (e.g. feed for ruminants, pigs, poultry, horses, rabbits,...).

VEGONIA 2 FEBBRAIO 2019

Schema operativo 2

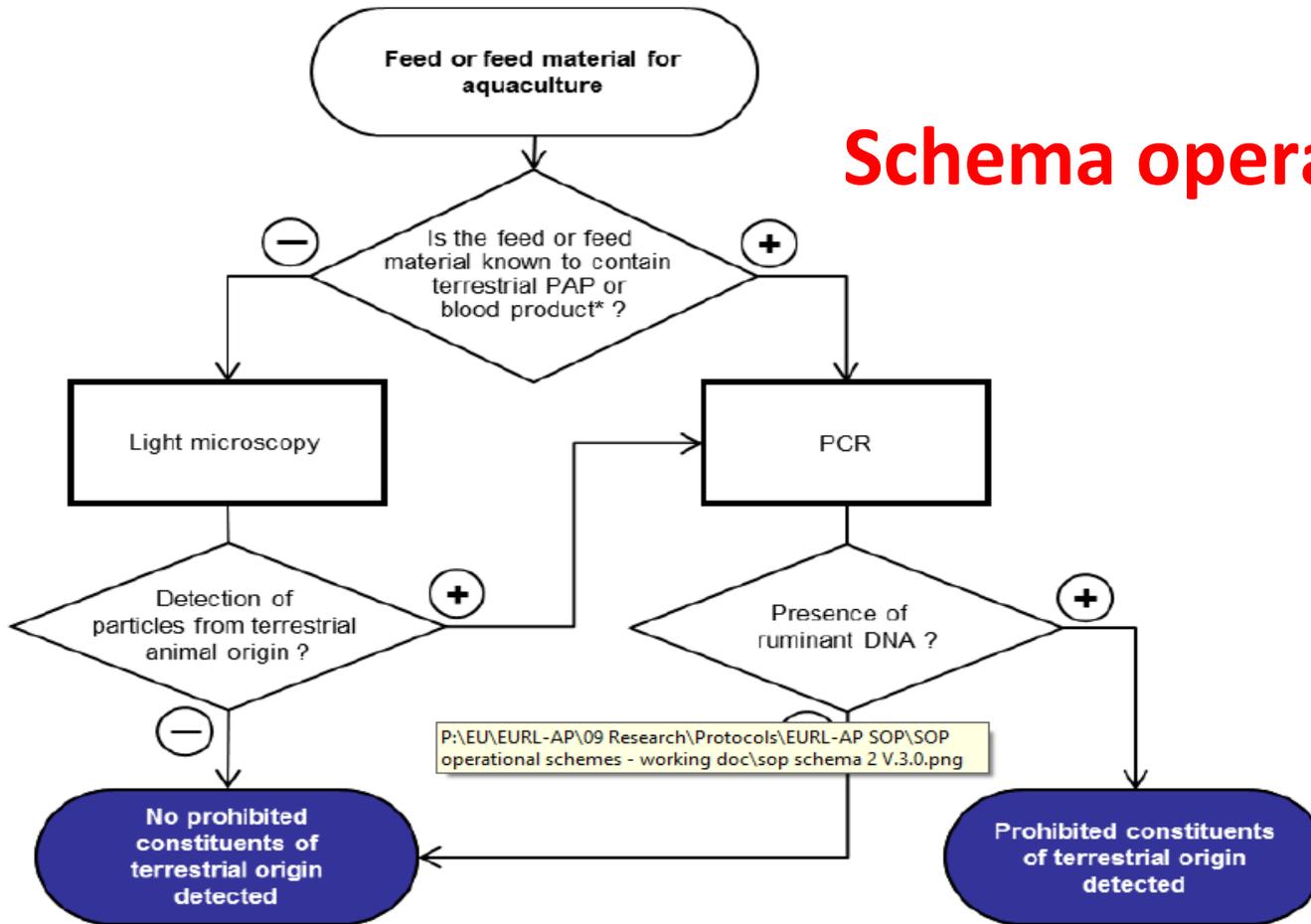
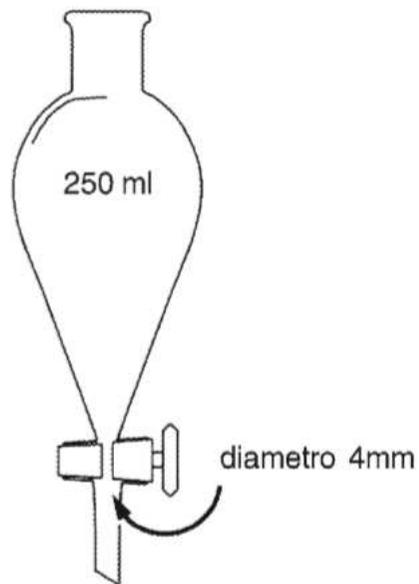


Figure 2. Operational protocol for the analysis of feed or feed material intended for aquaculture animals. (* in case of blood product cf. last paragraph of section 7.3. for details)

Metodo microscopico



Imbuto separatore



- Preparazione del sedimento e del flottato con TCE
- Lettura vetrini a fresco del sedimento e del flottato/tal quale su microscopio ottico
- Uso di reagenti nell'identificazione dei costituenti di origine animale (es. Reattivo di Fehling per le fibre muscolari; TMB+H₂O per sangue e derivati)

Metodo real-time PCR

- **Sviluppata dal laboratorio TNO Triskelion bv**
- **Validazione IS EURL-AP**
- **Implementazione EURL-AP**
- **Simultanea identificazione di cinque specie di ruminanti (bovino - *Bos taurus*, pecora - *Ovis aries*, capra - *Capra hircus*, cervo rosso - *Cervus elaphus* e capriolo - *Capreolus capreolus*)**
- **Metodo qualitativo (presenza/assenza)**
- **è l'unica da applicarsi in caso di controllo ufficiale.**

Metodo real-time PCR

- Estrazione del DNA di ruminante (KIT- Wizard magnetic purification system for food) dal mangime
- Amplificazione del DNA di ruminante estratto dal mangime



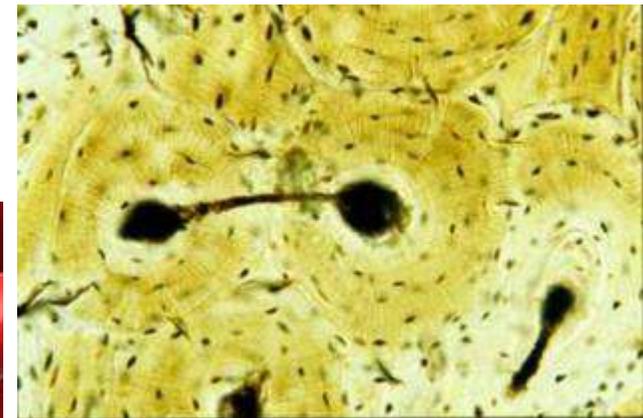
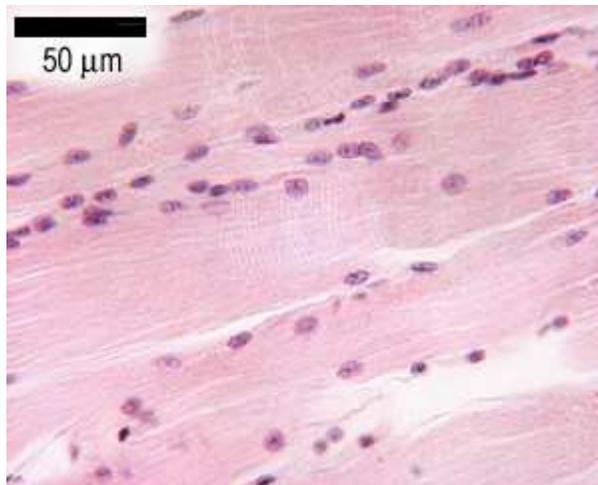
Real time PCR:

target di amplificazione sequenza specifica di 85/86 paia di basi

Estremamente abbondante

Target nucleare multicopia

Metodo Qualitativo



Real time PCR:

Determinazione del valore soglia (positivo / negativo)

Intensità della fluorescenza > soglia (threshold)

Registrazione del numero di cicli “Ct” value.

Ct value paragonato al cut-off

Cut-off predeterminato usando di materiali di riferimento

Cut-off strettamente correlato alle caratteristiche del termociclatore e dei reagenti

Cut-off non può essere trasferito ad un altro termociclatore

Master mix approvata da EURL-AP



Criticità

Microscopia ottica:

molto sensibile

legato unicamente all'esperienza dell'operatore

Controlli su base campionaria e non è possibile escludere contaminazioni che possano non essere intercettate dai controlli ufficiali.

Real time PCR :

DNA di ruminante indicatore di ingredienti vietati (PAT o prodotti a base di sangue di ruminante)

MA anche indicatore di ingredienti consentiti (latte e derivati del latte)



Interpretazione dei risultati di laboratorio:

Nota Ministeriale 0010848 - P – 02/05/2016

Da tenere a mente:

**Le PAT sono disciplinate del Regolamento (CE)
999/2001 e successive modifiche**



LC-MS/MS

**identificazione e quantificazione delle proteine
di carne di ruminante nei mangimi**

discriminazione tra PAT ruminante e latte.



***Progetto Ricerca di PAT di
ruminante nei mangimi
attraverso analisi LC-MS/MS di
peptidi markers***

Finanziato dal Ministero della Salute

Progetto 16 CEA

Responsabile scientifico Cristina Casalone



- **Identificati 3 peptidi specie-specifici e tessuto-specifici per bovino (proteine di origine: desmina, mioglobina, vimentina)**
- **Identificati 2 peptidi specie-specifici e tessuto-specifici per suino (proteine di origine: calsequestrina, anidrasi carbonica)**
- **Identificato 1 peptide specie-specifici e tessuto-specifici per pesce (enolasi)**

LC-MS/MS Identification of Species-Specific Muscle Peptides in Processed Animal Proteins

Daniela Marchis,^{*,†,⊥}  Alessandra Altomare,^{‡,⊥} Marilena Gili,[†] Federica Ostorero,[†] Amina Khadjavi,[†] Cristiano Corona,[†] Giuseppe Ru,[†] Benedetta Cappelletti,[§] Silvia Gianelli,[‡] Francesca Amadeo,[‡] Cristiano Rumio,^{||} Marina Carini,[‡] Giancarlo Aldini,[‡] and Cristina Casalone[†]

[†]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, via Bologna 148, 10154 Torino, Italy

[‡]Department of Pharmaceutical Sciences, Università degli Studi di Milano, Via Mangiagalli 25, 20133 Milano, Italy

[§]Italian Ministry of Health, Viale Giorgio Ribotta 5, 00144 Roma, Italy

^{||}Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Università degli Studi di Milano, Via Trentacoste 2, 20134 Milano, Italy

Supporting Information

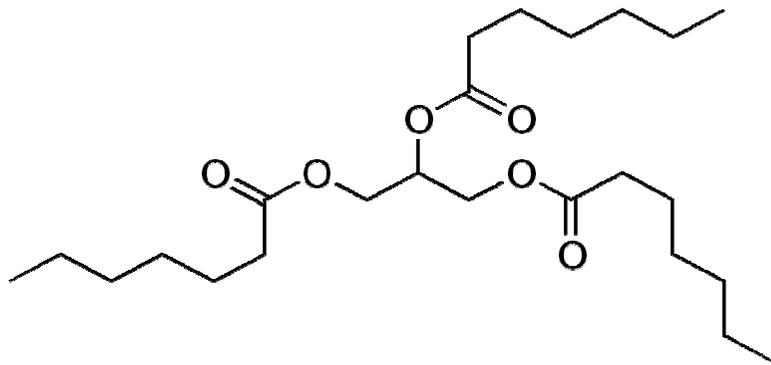
ABSTRACT: An innovative analytical strategy has been applied to identify signature peptides able to distinguish among processed animal proteins (PAPs) derived from bovine, pig, fish, and milk products. Proteomics was first used to elucidate the proteome of each source. Starting from the identified proteins and using a funnel based approach, a set of abundant and well characterized peptides with suitable physical-chemical properties (signature peptides) and specific for each source was selected. An on-target LC-ESI-MS/MS method (MRM mode) was set up using standard peptides and was then applied to selectively



- **Sviluppo metodica quali/quantitativa per la determinazione dei peptidi marker del bovino nei mangimi**

GTH

Triptanoato di glicerolo: marcatore che deve essere aggiunto alle farine di carne e ai grassi di categoria 1 e 2 (Regolamento della Commissione (CE) 142/2011)



Grasso sintetico

a) il GHT deve essere addizionato ai prodotti derivati sottoposti in precedenza a un trattamento termico sterilizzante a una temperatura di almeno 80 o al centro della massa che li preservi da successive ricontaminazioni;

b) tutti i prodotti derivati contengano in modo omogeneo in tutta la massa una concentrazione minima di **250 mg di GHT** per chilo di grasso.



SVILUPPO METODO

Ottobre 2012

Food Control 34 (2013) 624–629

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect



Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Short communication

A monitoring study of glyceroltriheptanoate (GTH) in animal by-products through a validated GC–MS analytical method

 CrossMark

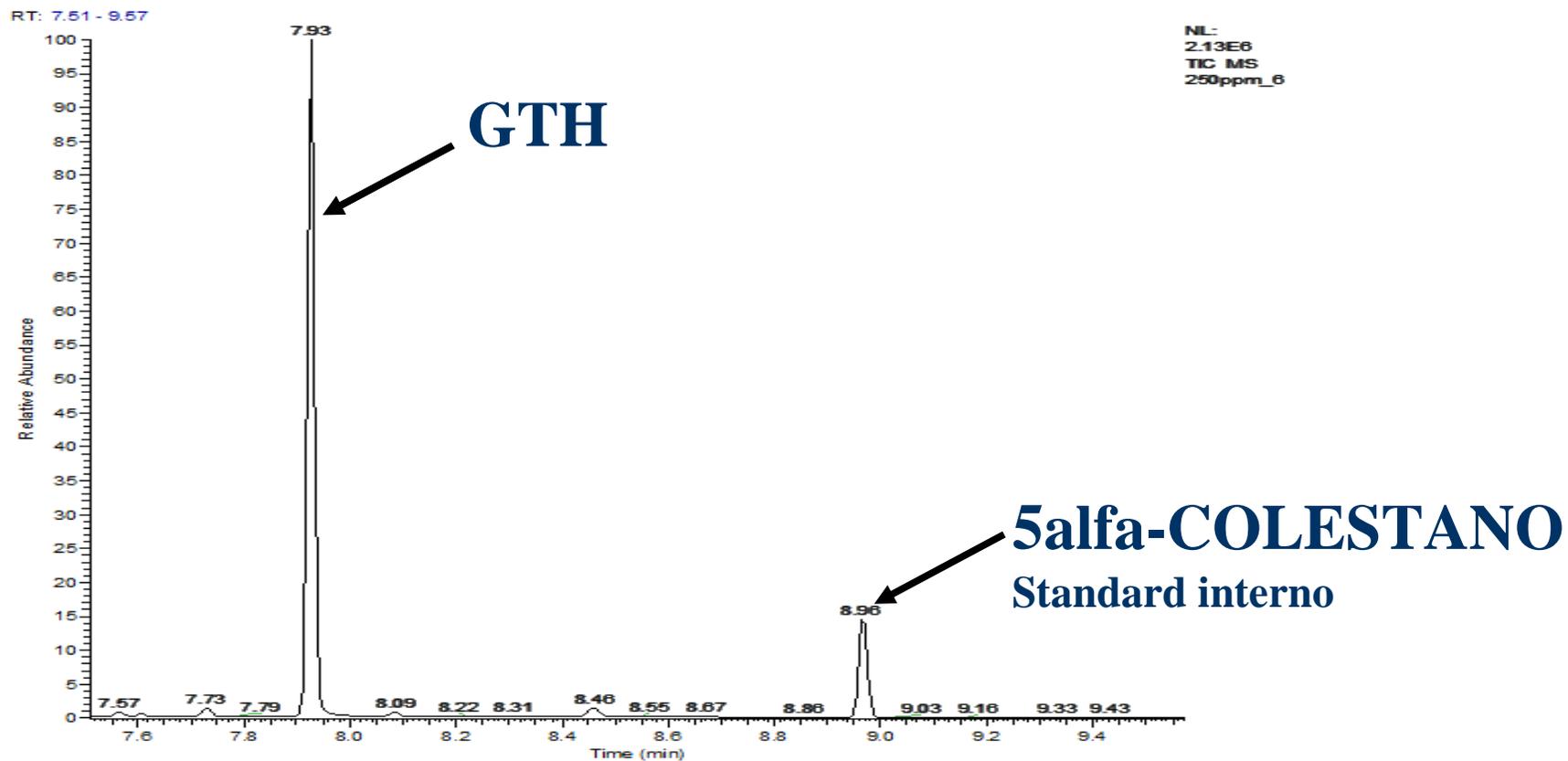
D. Marchis*, G. Amato, M.C. Abete

National Reference Centre on Feed (C.Re.AA.), Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, 10154 Torino, Italy

<p>ARTICLE INFO</p> <p><i>Article history:</i> Received 14 February 2013 Received in revised form 5 June 2013 Accepted 8 June 2013</p> <p><i>Keywords:</i> Glyceroltriheptanoate Animal by-products GC–MS</p>	<p>ABSTRACT</p> <p>According to Commission Regulation (EU) No 142/2011, animal by-products (ABPs) not intended for human consumption should be excluded from the food chain, as they are a potential source of risks to public and animal health. As an example, in recent years an improper use of certain ABPs brought to a spread of bovine spongiform encephalopathy (BSE). Therefore, Commission Regulation (EU) 142/2009 forces producers to mark permanently the ABPs not intended for human consumption (category 1 and category 2), with glyceroltriheptanoate (GTH). All EU Member States have the duty to control the content of GTH in ABPs, which should be present homogeneously throughout the substance at a minimum concentration of at least 250 mg GTH per kg fat. Starting from a Joint Research Centre procedure (von Holst, Boix, Bellorini, Androni, & Serano, 2009), a method based on gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS) was studied and validated as stated by Regulation 882/2004, providing an efficient monitoring study on seventeen samples</p>
--	--



ANALISI IN GC-MS



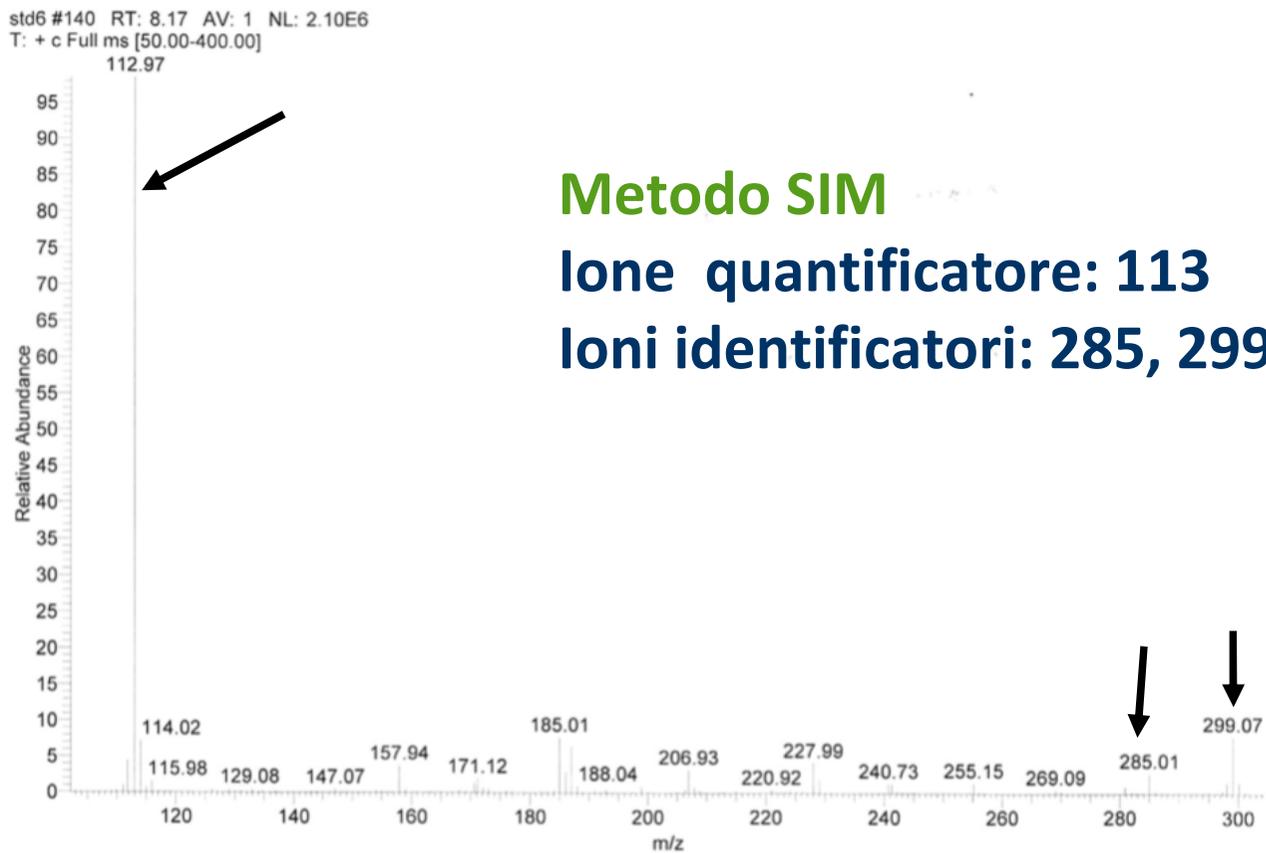


Fig. 2. GTH spectrum.



PNAA 2018-2020:

prevede la ricerca di GTH su

Farine e grassi Cat. 1

Farine e grassi Cat. 2

PAT e grassi Cat. 3



Alcuni spunti di riflessione...

Sviluppo Metodo LC-MS/MS necessita di PAT di bovino e di suino pure

PAT da stabilimenti di produzione e dal territorio (grossisti, depositi).

Molte cross contaminazioni con PAT di altra specie:

- **8 PAT di bovino tutte contenenti DNA suino**
- **10 PAT di suino 9 contenenti DNA anche DNA di ruminante**



Alcuni spunti di riflessione...

2015-2017 GTH 98 campioni eseguiti

17 campioni esito difforme:

8 farine categoria 1 GTH <250 mg/kg

In 1 campione GTH assente.

7 farine categoria 2 GTH <250 mg/kg

2 PAT di categoria 3 contenevano GTH:

Campione 1 Cat 3 meal GTH 187.2 ± 1.5 mg/kg

Campione 2 Cat 3 meal GTH 91.5 ± 7.3 mg/kg



Alcuni spunti di riflessione...

Eventuali fonti di contagio esterne all'UE

Casi sporadici BSE in Paesi Terzi

incidenza probabilmente sottostimata
(sorveglianza OIE molto più blanda di UE)



Vi ringrazio per l'attenzione

Ciò che io non so, neppure ritengo di saperlo

Socrate