

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e
Toscana

DANIELA
VERGINELLI

RISO GM NON AUTORIZZATO CINESE. AGGIORNAMENTO TEORICO- PRATICO SUI METODI IN SYBR@GREEN

Roma 10 Giugno 2016



Centro di Riferenza Nazionale per la ricerca di OGM

Laboratorio Nazionale di Riferimento per gli alimenti e mangimi GM



RISO GM

- ⊙ Un numero sempre maggiore di riscontri di riso GM non autorizzato soprattutto proveniente dalla Cina
- ⊙ L'EURL-GMFF ne ha contate più di 25 varietà
- ⊙ Non ci sono informazioni sulla sequenza nucleotidica e la struttura molecolare
- ⊙ Conseguente difficoltà di rilevazione

Decisione 2013/287/EU (che implementa la Dec. 2011/884/EU)

L 162/10

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

14.6.2013

DECISIONE DI ESECUZIONE DELLA COMMISSIONE

del 13 giugno 2013

che modifica la decisione di esecuzione 2011/884/UE recante misure di emergenza relative alla presenza di riso geneticamente modificato non autorizzato nei prodotti a base di riso originari della Cina

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(2013/287/UE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 53, paragrafo 1,

considerando quanto segue:

(1) La decisione di esecuzione 2011/884/UE della Commissione, del 22 dicembre 2011, recante misure di emergenza relative alla presenza di riso geneticamente modificato non autorizzato nei prodotti a base di riso originari della Cina e che abroga la decisione 2008/289/CE ⁽²⁾ prevede un riesame delle misure di emergenza ivi previste al fine di valutare se continuano ad essere necessarie e adeguate all'obiettivo perseguito.

(2) Dall'entrata in vigore della decisione di esecuzione 2011/884/UE si sono registrate 56 notifiche degli Stati membri al sistema di allarme rapido per gli alimenti e i mangimi (RASFF), istituito dal regolamento (CE) n. 178/2002, riguardanti riso geneticamente modificato non autorizzato in prodotti a base di riso originari dalla

decisione di esecuzione 2011/884/UE. Va inoltre prevista la possibilità per le autorità competenti di fare controlli fisici su altri prodotti.

Oltre a ciò, alcuni Stati membri hanno sottolineato durante il processo di riesame che i requisiti di cui alla decisione di esecuzione 2011/884/UE relativi alla notifica preventiva delle partite non sono pienamente in linea con i requisiti di cui al regolamento (CE) n. 669/2009 della Commissione, del 24 luglio 2009, recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo al livello accresciuto di controlli ufficiali sulle importazioni di alcuni mangimi e alimenti di origine non animale e che modifica la decisione 2006/504/CE della Commissione ⁽³⁾ e, ove applicabile, al regolamento (CE) n. 136/2004 della Commissione, del 22 gennaio 2004, che fissa le modalità dei controlli veterinari da effettuare ai posti d'ispezione frontali della Comunità sui prodotti importati da paesi terzi ⁽⁴⁾. Il regolamento (CE) n. 669/2009 prevede l'obbligo per gli operatori del settore alimentare e dei mangimi di compilare la parte I del documento comune di entrata di cui all'allegato II del medesimo atto di importazione mangimi e alimenti di origine non animale oggetto di tale regolamento. Parimenti, il regolamento (CE) n. 136/2004, prevede l'obbligo di compilare il documento veterinario comune di entrata di cui all'allegato III del medesimo atto di importazione prodotti che rientrano nel suo ambito di applicazione. Allo scopo di migliorare l'efficienza dei controlli ufficiali, è quindi opportuno allineare i requisiti in materia di notifica preventiva di cui alla decisione di esecuzione 2011/884/UE a quelli

Dec. 2011/884/EU

- ⊙ Controllo effettuato sul 100% della partite
- ⊙ La merce deve essere accompagnata dal certificato sanitario
- ⊙ La merce deve essere accompagnata dal report analitico
- ⊙ Il controllo viene effettuato sulla lista dei prodotti indicati nell'Annex I
- ⊙ Nell'Annex II vengono date indicazioni sui metodi di campionamento ed analisi

LIST OF PRODUCTS

Product	CN code
Rice in the husk (paddy or rough)	1006 10
Husked (brown) rice	1006 20
Semi-milled or wholly milled rice, whether or not polished or glazed	1006 30
Broken rice	1006 40 00
Rice flour	1102 90 30
Rice groats and meal	1103 19 50
Rice pellets	1103 20 50
Flaked rice grains	1104 19 91
Rolled or flaked cereal grains (excluding grains of oats, wheat, rye, maize and barley, and flaked rice)	1104 19 99
Rice starch	1108 19 10
Preparations for infant use, put up for retail sale	1901 10 00
Uncooked pasta, not stuffed or otherwise prepared, containing eggs	1902 11 00
Uncooked pasta, not stuffed or otherwise prepared, not containing eggs	1902 19
Stuffed pasta, whether or not cooked or otherwise prepared	1902 20
Other pasta (other than uncooked pasta, not stuffed or otherwise prepared, and other than stuffed pasta, whether or not cooked or otherwise prepared)	1902 30
Prepared foods obtained by swelling or roasting cereals or cereal products, obtained from rice	1904 10 30
Preparations of the muesli-type based on unroasted cereal flakes	1904 20 10
Prepared foods obtained from unroasted cereal flakes or from mixtures of unroasted cereal flakes and roasted cereal flakes or swelled cereals, obtained from rice (excluding preparations of the muesli-type on the basis of unroasted cereal flakes)	1904 20 95
Rice, pre-cooked or otherwise prepared, not elsewhere specified or included (excluding flour, groats and meal, food preparations obtained by swelling or roasting or from unroasted cereal flakes or from mixtures of unroasted cereal flakes and roasted cereal flakes or swelled cereals)	1904 90 10
Ricepaper	ex 1905 90 20
Biscuits	1905 90 45
Extruded or expanded products, savoury or salted	1905 90 55
Bran, sharps and other residues, whether or not in the form of pellets, derived from the sifting, milling or other working of rice with a starch content not exceeding 35 % by weight	2302 40 02
Bran, sharps and other residues, whether or not in the form of pellets, derived from the sifting, milling or other working of rice other than with a starch content not exceeding 35 % by weight	2302 40 08
Peptones and their derivatives: other protein substances and their derivatives, not elsewhere specified or included: hide powder, whether or not chromed	3504 00 00

Methods of sampling and analysis for official control regarding unauthorized genetically modified organism in rice products originating from China

1. General provisions

Samples intended for the official control for the absence of GM rice in rice products shall be taken according to the methods described in this Annex. The bulk samples thus obtained shall be considered as representative of the lot from which they are taken.

2. Sampling

2.1. Sampling lots of bulk commodities and preparation of the analytical sample

The number of incremental samples which make up the bulk sample and the preparation of the analytical sample shall be made in accordance with Recommendation 2004/78/EC and Regulation (EC) No 1831/2004 for feed. The size of the laboratory sample shall be 2.5 kg but may be reduced to 500 grams for processed food or feed. For the purpose of Article 1(5) of Regulation (EC) No 1831/2004, a second laboratory sample shall be constituted from the bulk sample.

2.2. Sampling of prepacked food and feed

The number of incremental samples for the constitution of the bulk sample and the preparation of the analytical sample shall be made in accordance with CEN/ISO 15688 or equivalent. The size of the laboratory sample shall be 2.5 kg but may be reduced to 500 grams for processed food or feed. For the purpose of Article 1(5) of Regulation (EC) No 1831/2004, a second laboratory sample shall be constituted from the bulk sample.

3. Analysis of the laboratory sample

The laboratory analysis at the point of origin shall be carried out in a designated AOSQ laboratory, and prior to release for free circulation in the Union in a Member State designated official control laboratory. Screening tests shall be performed by real-time PCR according to the method published by the EU-RL CMFF⁽¹⁾, for at least the following genetic elements: the CAMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S promoter, the NOS (neopaline synthase) terminator from *Agrobacterium tumefaciens* and the engineered CryIAb, CryIIAc and/or CryIIAb/CryIIAc from *Bacillus thuringiensis*.

In the case of grain samples the designated control laboratory shall take from the homogenised laboratory sample four analytical samples of 240 grams (equivalent 10 000 rice grains). For processed products such as flour, pasta or starch the analytical samples this may be reduced to 135 grams. The four analytical samples shall be ground and further analysed separately. Two extractions shall be made from each analytical sample. One PCR test for each GM genetic element shall be made for each extraction in accordance with the screening methods detailed under point 4 below. The consignment shall be considered non-compliant if at least one GM genetic element is considered detectable in at least one analytical sample of the consignment according to the guidelines provided in the EU-RL report.

4. The following analytical methods shall be used:

(a) For screening for the CAMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S promoter and the NOS (neopaline synthase) terminator from *Agrobacterium tumefaciens*.

ISO 21570: 2005 Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products—quantitative nucleic acid based methods. Annex B1.

H-U. Wahlbinger *et al.*, (2008) Validation and collaborative study of a P35S and T-*nos* duplex real-time screening method to detect genetically modified organisms in food products. Eur. Food Res. and Technol., Volume 226, 1221-1228.

E. Barban-Piadonier *et al.*, (2010) SYBR®Green qPCR screening methods for the presence of 35S promoter and "NOS terminator" elements in food and feed products. Eur. Food Res. and Technol. Volume 230, 187-193.

Relling R, Broll H, Wahlbinger HU, Grollmann I. (2007) Collaborative study of a T-*nos* real-time PCR method for screening of genetically modified organisms in food products. J. Vet. Lab. 21:116-121.

⁽¹⁾ <http://gmof-jrc.europa.eu>

Decisione 2013/287/EU

(che implementa la Dec. 2011/884/EU)

- © C'è l'aggiunta dei prodotti trasformati a base di riso
- © Viene indicata la diminuzione dei replicati di analisi per prodotti trasformati



EUROPEAN COMMISSION
JOINT RESEARCH CENTRE

Institute for Health and Consumer Protection
Molecular Biology and Genomics Unit



EURL-MV-01/11VRrev1

Revised Guidance on the Detection of Genetically Modified Rice Originating from China Using Real-Time PCR for the detection of P-35S, T-nos and Cry1Ab/Ac

8 May 2014

European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed

Executive Summary

In support to the Commission Implementing Decision 2013/287/EU¹, amending Decision 2011/884/EU², the European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EU-RL GMFF) prepared a revision of the previously³ published guidance document. This document provides further guidance on the correct use of the methods indicated in the Decision, including measures aimed at improving the specificity of the detection approach.

This revised guidance, as its previous version, is exclusively meant for the implementation of Decision 2013/287/EU and should not be used for other screening activities. Laboratories should apply it only in conjunction with good standard practices for testing for the presence of GMOs (e.g. use of appropriate controls).

RISO CINESE

- ⊙ In questo caso le comuni analisi di routine non si possono usare
- ⊙ Per mancanza di informazioni e materiali di riferimento non si possono accreditare queste prove (ISO 17025) in quanto non possono essere incluse nello scopo dell'accREDITamento

METODI DI RILEVAZIONE

- © Vengono utilizzate due diverse tecniche:
- PCR real time con la chimica SYBR GREEN®
 - PCR real time con la chimica Taqman®

P-35S/T-NOS duplex Taqman®

- © Sviluppato in Germania dal BVL
- © Si tratta di una PCR duplex
- © In un volume di 25 µl si amplificano sia il P-35S che il T-NOS

(Weiblinger et al., (2008) "Validation and collaborative study of a P35S and T-NOS duplex real time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products" Eur Food Res Technol 226:1221-1228)

PCR SYBR GREEN®

©Sviluppato in Belgio dall'Istituto
Scientifico di salute pubblica di Bruxelles

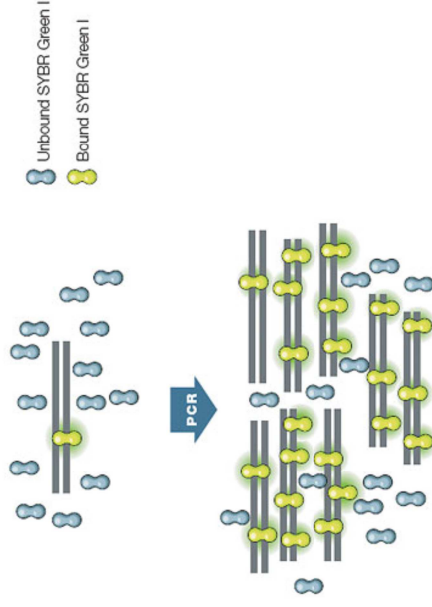
©Si tratta di 4 PCR real time:

- PLD
- P-35S
- T-NOS
- CryIAb/Ac

*(Barbau-Piednoir et al., (2010) Eur Food Res Technol 230:383-393;
Barbau-Piednoir et al., (2011) Eur Food Res Technol DOI
10.1007/s00217-011-1605-7)*

SYBR® GREEN I DYE

- ⊙ E' il più comune colorante usato nelle PCR real time
- ⊙ Si lega in modo aspecifico al DNA a doppia elica (dsDNA)
- ⊙ E' poco fluorescente quando è libero in soluzione
- ⊙ La fluorescenza aumenta fino a 1000 volte quando lega il dsDNA
- ⊙ La misura diretta del prodotto di PCR si ha per l'aumento della fluorescenza



Allestimento della PCR

© 20 µl di 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix
(Applied Biosystems)

© 250 nM di ciascun primer

© 5 µl di DNA

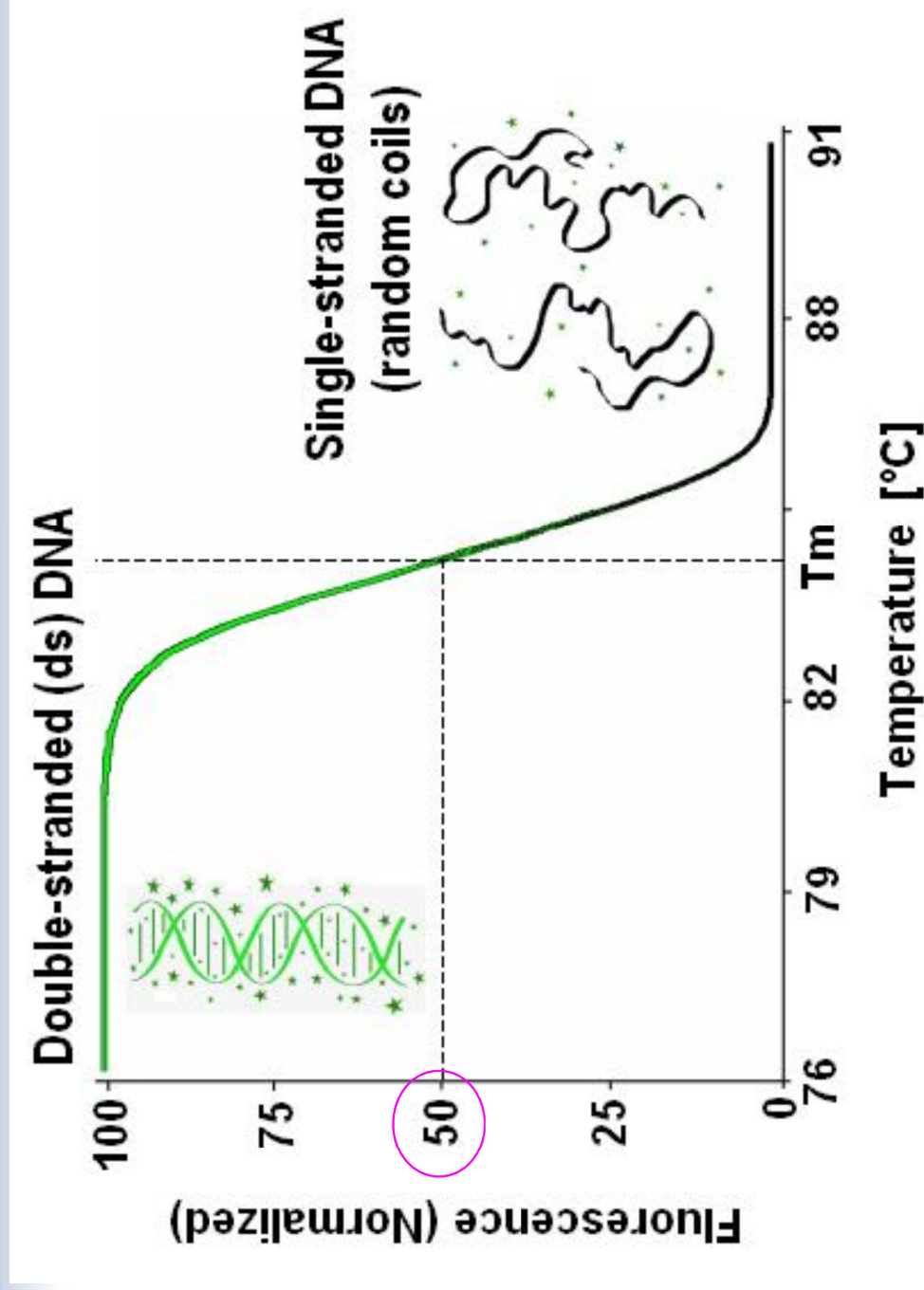
© Profilo termico:

10 min a 95°C	(attivazione polimerasi)
40x 15 sec a 95°C	(fase di denaturazione)
40X 1 min a 60°C	(fase di estensione/allung.)
± 1.75°C/min da 60°C a 95°C (analisi curva di melting)	

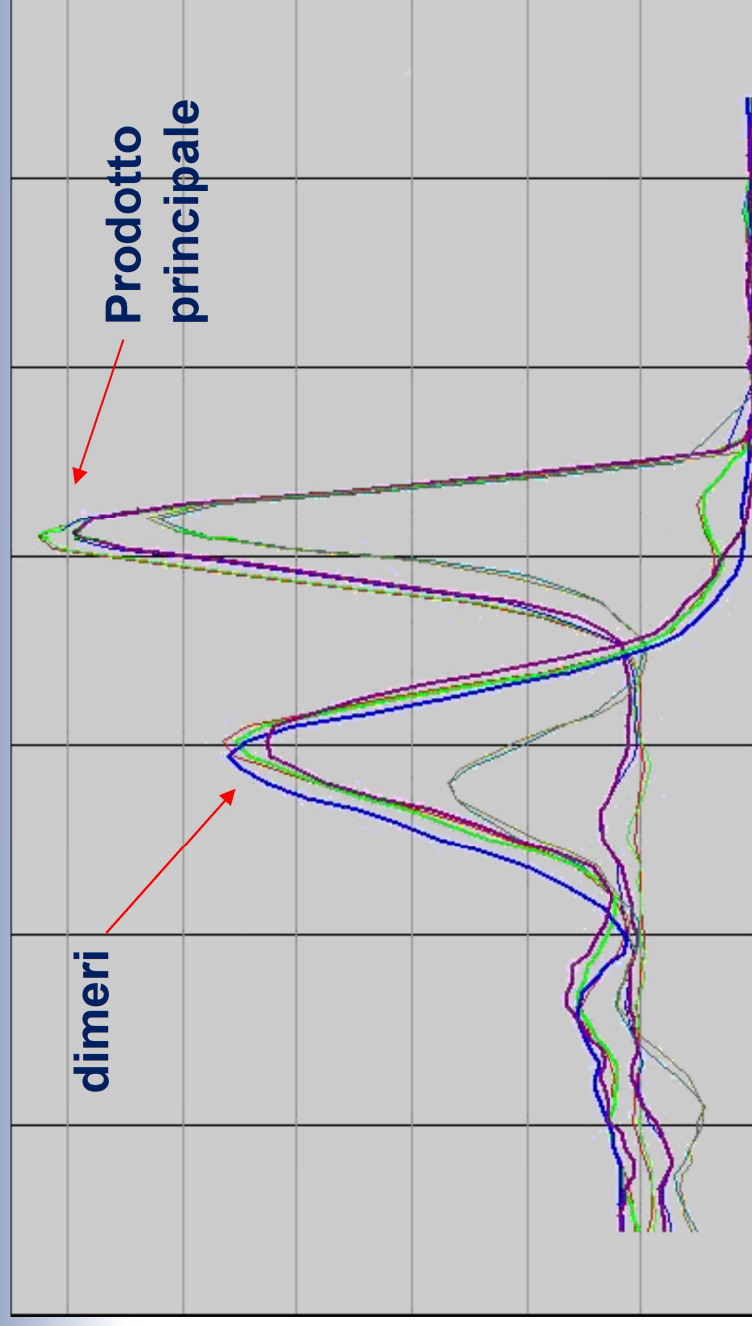
Analisi della curva di melting

- ⊙ **TEMPERATURA DI MELTING (T_m)** è definita come la temperatura alla quale la metà del DNA si trova nello stato a doppia elica, e la metà in quello denaturato.
- ⊙ La temperatura di melting dipende sia dalla lunghezza totale della molecola di DNA, sia dalla specifica sequenza dei **NUCLEOTIDI** (il contenuto di **G/C**).

CURVA DI DISSOCIAZIONE



Derivata 1^a della curva di dissociazione

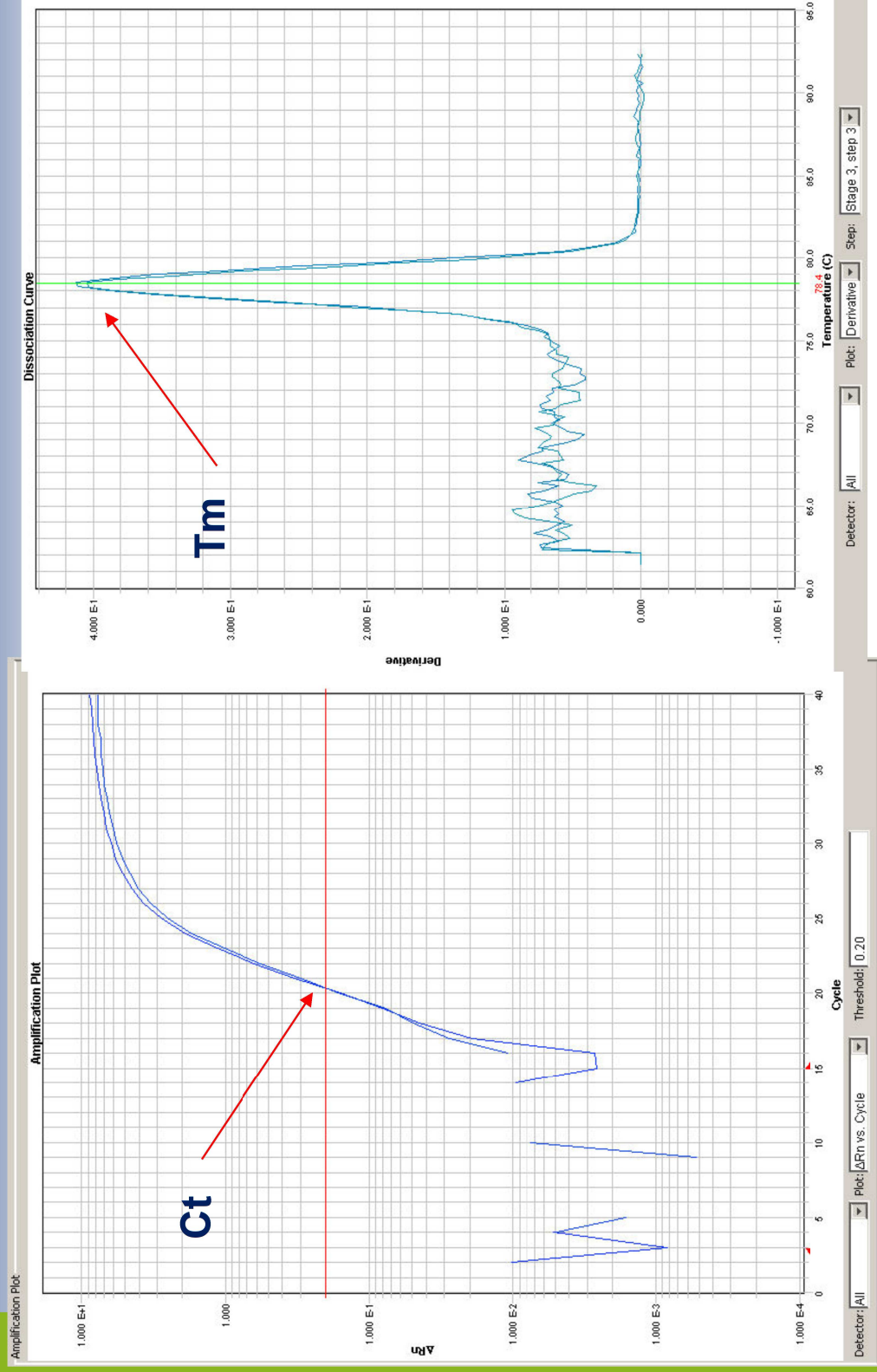


Graficamente rappresenta il punto di flesso della curva di dissociazione** (o il punto di massimo della derivata prima, cambiata di segno, di tale curva).

PARAMETRI DA CONSIDERARE

- ⊙ **Ct** punto di intersezione fra il threshold e la curva di amplificazione del DNA, ossia il numero di cicli del campione alla fluorescenza del threshold
- ⊙ **Tm** 50% delle molecole sono denaturate

ESEMPIO: AMPLIFICAZIONE PLD

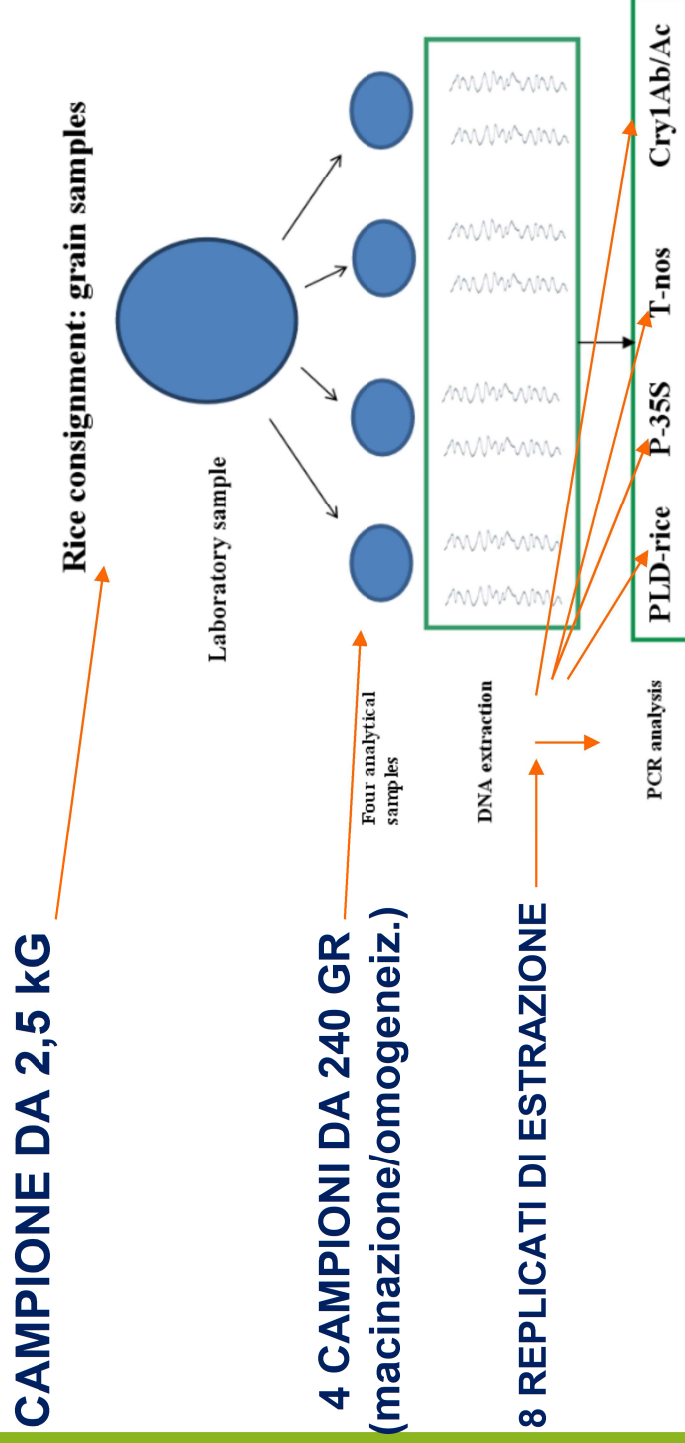


METODO

(Revised Guidance on the Detection of Genetically Modified Rice Originating from China Using Real-Time PCR for the detection of P-35S, T-nos and Cry1Ab/Ac EURL-MV-01/11VRrev1)

EURL-MV-01/11VRrev1

Figure 1: Analytical scheme of the PCR screening procedure for the presence of GM rice materials in rice consignments of grain samples originating from China (detailed description is given in the text)

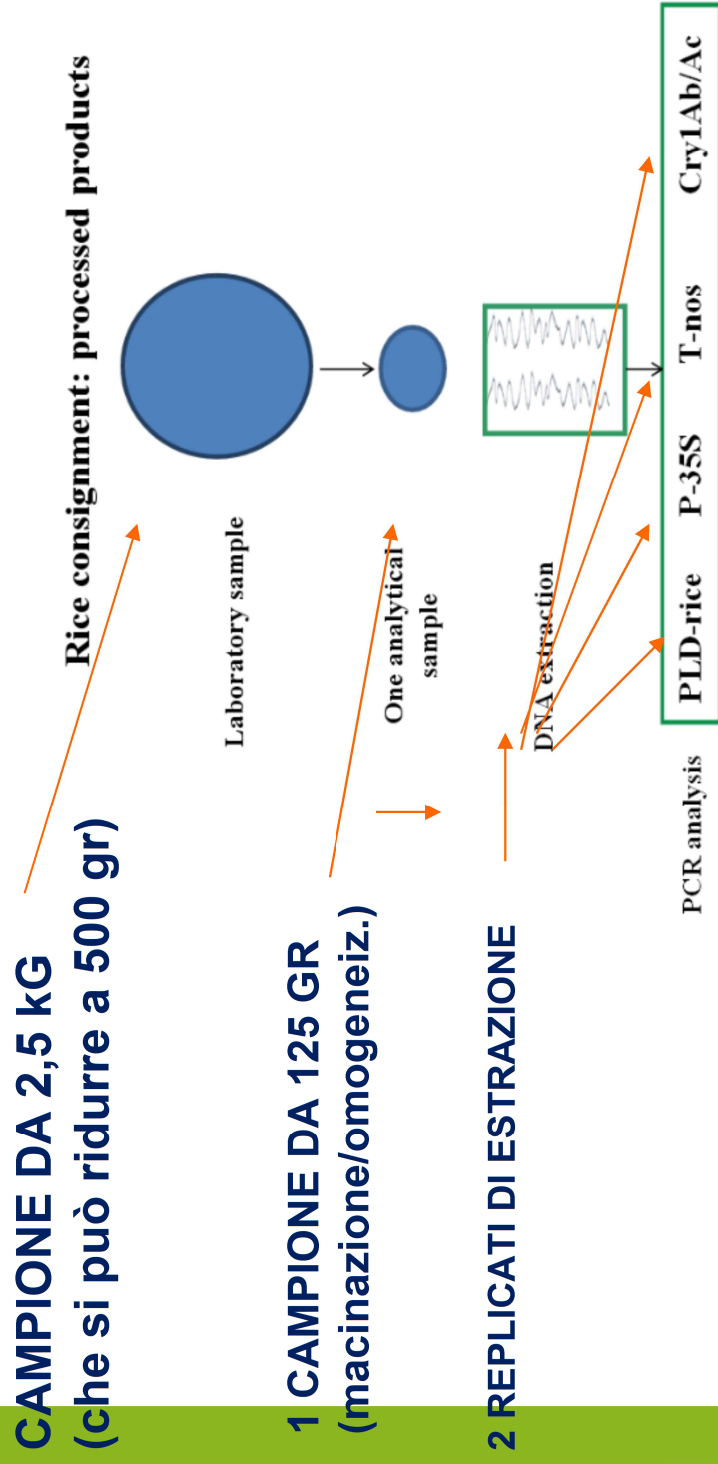


METODO

(Revised Guidance on the Detection of Genetically Modified Rice Originating from China Using Real-Time PCR for the detection of P-35S, T-nos and Cry1Ab/Ac EURL-MV-01/11VRrev1)

EURL-MV-01/11VRrev1

Figure 2: Analytical scheme of the PCR screening procedure for the presence of GM rice materials in consignments of rice processed products originating from China (detailed description is given in the text)



ESTRAZIONE DEL DNA



- ⊙ ESTRAZIONE MEDIANTE GENERON ION FORCE
- ⊙ CTR POSITIVI (CRM):
 - Bt11 (per P35S, TNOS, CryAI Ab/Ac)
 - MON810 (CryAI Ab/Ac) (altro frammento)
 - Bt63
 - Kefeng6



POSITIVITA' del Ct e della Tm

- ⊙ il valore di **Ct** è considerato positivo se presente una curva di amplificazione con andamento esponenziale sopra la linea del threshold
- ⊙ Il valore di **Tm** è positivo:
 - a) quando è compreso tra $\pm 1^{\circ}\text{C}$ rispetto al valore di Tm dei CTR POSITIVI (bt11 e MON810)
 - b) quando il Tm è pos ed il valore di $\text{Ct} \geq 33$ e l'altezza del picco è $\geq 20\%$ dell'altezza del picco del Tm del CTR pos

POSITIVITA' DEI SINGOLI PARAMETRI per il T_m

- ◉ Nel caso del **P-35S** e del **T-NOS** è generato un singolo amplicone quindi il criterio di accettabilità è' $\pm 1^{\circ}\text{C}$ rispetto al valore di T_m del ctr positivo (Bt11 o MON810)
- ◉ Nel caso del **CryIAb/Ac** sono generati due varianti di ampliconi con differenti valori di T_m uno per il Bt11 ed un altro per il MON810 quindi il criterio di accettabilità è' $\pm 1^{\circ}\text{C}$ rispetto ai due valori di T_m del Bt11 e del MON810

ESEMPIO:

Bt11 $T_m=78,5^{\circ}\text{C}$ ($77,5^{\circ}\text{C}<\text{pos}<79,5^{\circ}\text{C}$)

MON810 $T_m=80,5^{\circ}\text{C}$ ($79,5^{\circ}\text{C}<\text{pos}<81,5^{\circ}\text{C}$)



$77,5^{\circ}\text{C}<\text{POS}<81,5^{\circ}\text{C}$

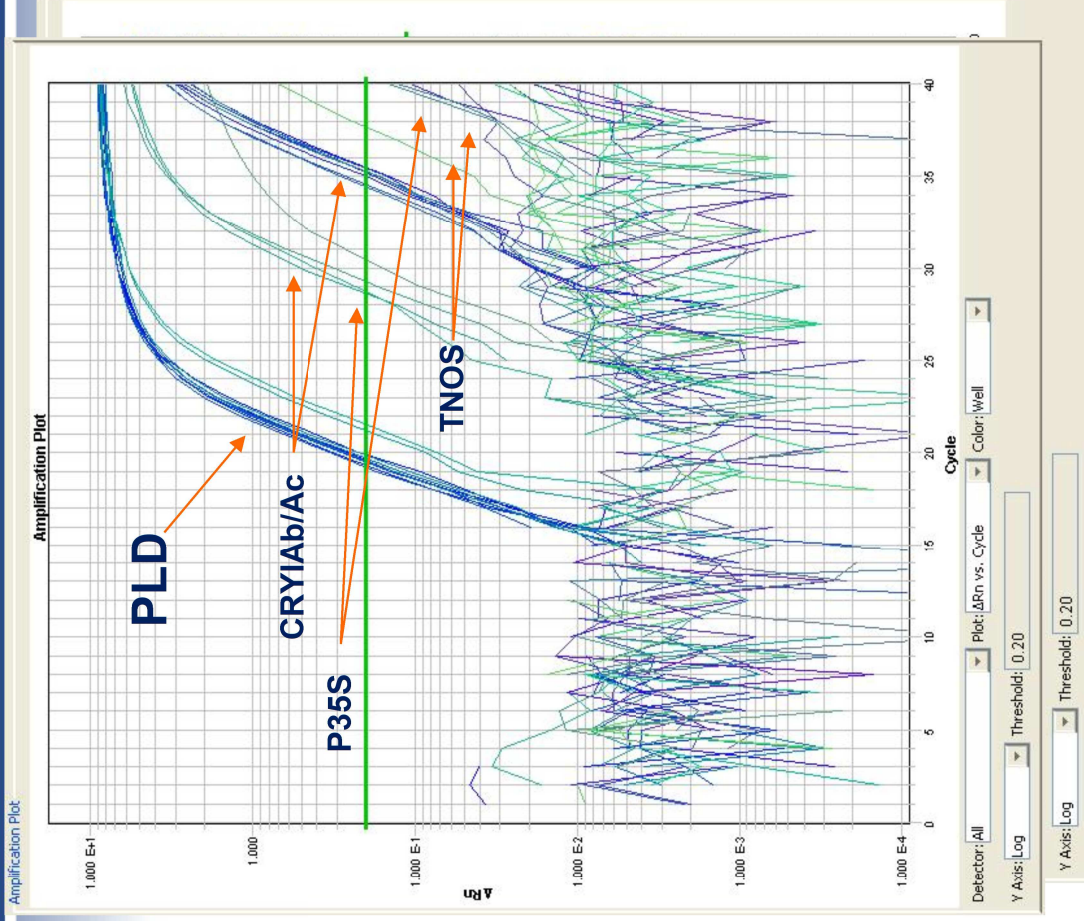
POSITIVITA' DEL CAMPIONE su un singolo replicato

- © UN ELEMENTO GENETICO E' CONSIDERATO PRESENTE (**RILEVATO**) QUANDO **SIA IL Ct che la Tm SONO POSITIVI**, IN TUTTI GLI ALTRI CASI L'ELEMENTO GENETICO E' NON RILEVATO:

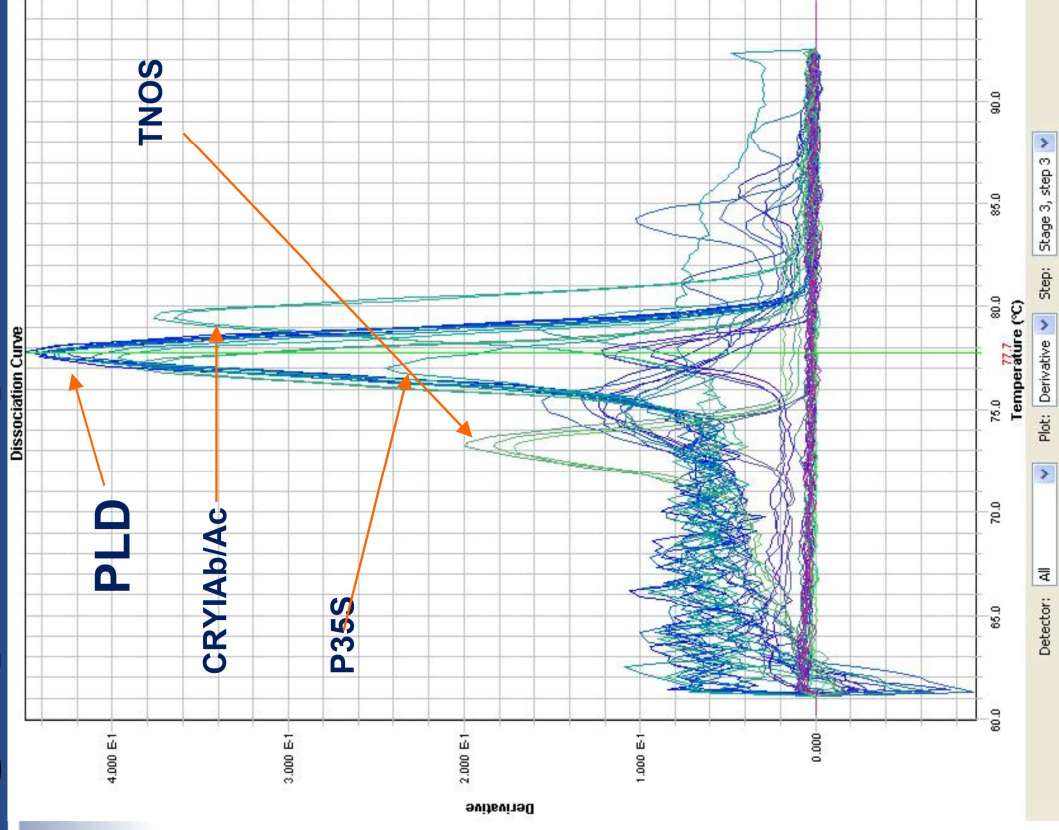
Ct - Tm

- Pos-Pos=**RILEVATO**
- Pos-Neg= **NON RILEVATO**
- Neg-Pos= **NON RILEVATO**
- Neg-Neg= **NON RILEVATO**

Campione positivo curve di amplificazione (tutte)



Campione positivo curve di melting (tutte)



POSITIVITA' DEL CAMPIONE su due replicati

EURL-MV-01/11 Rev1

Table 2: Decision tables for the outcome of a real-time PCR analysis of DNA extracts (E) from a rice analytical samples

2.A: SYBR® Green PCR methods

The rules are:

- 1) If T_m and C_q are both positive, the measurement results is = (+) >> positive
- 2) If T_m or C_q are negative, the measurement result is negative

And:

- 3) If E1 & E2 are positive, the measurement result is positive
- 4) If E1 & E2 are negative, the measurement result is negative
- 5) If E1 or E2 are positive and E2 or E1 are negative, repeat the positive extract. If the repetition is again positive, the final outcome is positive, too. If the repetition is negative the sample is negative.

E 2		E 1		T_m	C_q	T_m	C_q	T_m	C_q	T_m	C_q
T_m	C_q			+	+	+	-	-	+	-	-
+	+			Positive	Negative	Repeat E2	Negative	Repeat E2	Repeat E2	Negative	Negative
+	-	Positive	Negative	Repeat E1	Negative	Repeat E1	Negative	Repeat E1	Repeat E1	Negative	Negative
-	+	Negative	Positive	Repeat E1	Negative	Repeat E1	Negative	Repeat E1	Repeat E1	Negative	Negative
-	-	Negative	Negative	Repeat E1	Negative	Repeat E1	Negative	Repeat E1	Repeat E1	Negative	Negative

POSITIVITA' DEL CAMPIONE

- © In tutti i casi un valore **negativo di T_m**, nonostante un valore positivo di Ct, determina la **NEGATIVITA'** del campione

"Riassumendo..."

- ⊙ il campione viene considerato POS se sia la T_m che il C_t sono Pos nei 2 replicati
- ⊙ il campione viene considerato NEG se sia la T_m che il C_t sono neg
- ⊙ Gli altri casi, a seconda degli esiti di T_m e C_t sui due replicati, sono da considerarsi negativi oppure da ripetere

ESEMPI DI RISULTATI DELLO SCREENING su granella

Outcome of real-time PCR tests (3 examples)

Product A	Subsample 1	Subsample 2	Subsample 3	Subsample 4
PLD-rice	+/+	+/+	+/+	+/+
P-35S	-/-	-/-	-/-	-/-
T-nos	-/-	-/-	-/-	-/-
CryIAb/AC	-/-	-/-	-/-	-/-

Product B	Subsample 1	Subsample 2	Subsample 3	Subsample 4
PLD-rice	+/+	+/+	+/+	+/+
P-35S	-/-	-/-	-/-	-/-
T-nos	+/+	+/+	-/-	-/-
CryIAb/AC	-/-	+/+	-/-	-/-

Product C	Subsample 1	Subsample 2	Subsample 3	Subsample 4
PLD-rice	+/+	+/+	+/+	+/+
P-35S	-/-	-/-	-/-	-/-
T-nos	+/+	-/-	-/-	+/+
CryIAb/AC	-/-	-/-	-/-	+/+

Product D	Subsample 1	Subsample 2	Subsample 3	Subsample 4
PLD-rice	+/+	+/+	+/+	+/+
P-35S	-/-	-/-	-/-	-/-
T-nos	+/+	-/-	-/-	-/-
CryIAb/AC	-/-	-/-	-/-	-/-

Outcome:
No positive results
Conclusion:
GM negative

Outcome:
Positive results
Conclusion:
GM positive

Outcome:
Positive results
Conclusion:
GM positive

Outcome:
Dissimilar result
Retest: if "+" if "-"
Conclusion:
GM positive
GM negative

ESEMPI DI RISULTATI DELLO SCREENING su prodotti finiti

Outcome of real-time PCR screening (3 examples)

Conclusion

Product A	Sample A	GM negative
PLD-rice	+/+	
P-35S	-/-	
T-nos	-/-	
CryIAb/Ac	-/-	GM positive
Product B	Sample B	
PLD-rice	+/+	
P-35S	+/+	
T-nos	-/-	
CryIAb/Ac	-/-	GM positive
Product C	Sample C	
PLD-rice	+/+	
P-35S	-/-	
T-nos	-/-	
CryIAb/Ac	+/+	

Riso

Provenienza o origine cinese, in importazione o sul territorio

Campionamento ai sensi della Decisione 2011/834/UE e 2013/287/UE (riso cinese)

Provenienza o origine non cinese, in importazione o sul territorio

Campionamento ai sensi della Decisione 2011/834/UE e 2013/287/UE (Riso cinese) 2008/162/UE (LL601)

Campione globale

Prodotti sfusi	Prodotti confezionati
Food ► <u>Racc. 787/2004</u>	CEN/TS 15568:2007
Feed ► Reg. 152/2009 (Reg. 691/2013 <u>dal</u> 1/1/2014)	

Campioni di laboratorio

Materie prime	Prodotti trasformati
2,5 kg ^{lit}	500 g

Campioni analitici

Materie prime	Prodotti trasformati
4 × 240 g	1 × 125 g



DNA estratti

Materie prime	Prodotti trasformati
8 = 2 × ciascun campione analitico	2

Replicati PCR (per ciascuno dei target analitici in SybrGreen e TaqMan)

Materie prime	Prodotti trasformati
8 = 1 × ciascun DNA estratto	2 = 1 × ciascun DNA estratto

* Per gli USMAF e PIF devono essere effettuati 3 campioni di laboratorio da 2,5 Kg secondo la nota Mio. Salute DG SAN 0015199-F-10/05/2011

DNA estratti

Materie prime	Prodotti trasformati
4 = 1 × ciascun campione analitico (come riso LL601)	2

Replicati PCR (per ciascun target analitico): approccio tedesco "screening cascade" seguito, in caso di positività, da tipizzazione

Materie prime	Prodotti trasformati
4 = 1 × ciascun DNA estratto	2 = 1 × ciascun DNA estratto

Attenzione

- © Nel documento EURL è raccomandato di verificare che l'eventuale positività al P-35S ed il T-NOS non sia dovuta alla presenza di organismi naturali
- © Per esempio eseguire la PCR per il virus del mosaico del cavolfiore (CaMV)



Grazie per l'attenzione!

RINGRAZIAMENTI

Cinzia Quarchioni

Cristiana Fusco

Cristian Alimonti

Marisa Misto

Pamela Bonini

Stefania Peddis



daniela.verginelli@izslt.it