50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN
Centro
Nacional de
Alimentación

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR DIGITAL (dPCR) EN OMGs

Daniel Prieto Carvajal
Facultativo. Servicio de Biotecnología del CNA

JORNADAS DE REFERENCIA CNA
4 y 5 JUNIO 2024

MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición

50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

SUMARIO

01

Recorrido PCR. 3 Generaciones

02

Fundamento de la PCR digital

03

ddPCR en el análisis de OMGs

04

Actualidad y retos del CNA en ddPCR

01. Recorrido de la PCR. 3 Generaciones.

1986

Kary Mullis desarrolla la PCR

Permite la creación de un gran número de copias de ADN

1991

RT-PCR

Desarrollo de la PCR con transcripción inversa

2003

PCR en tiempo real

Amplificación y detección simultáneas. Uso de sondas fluorescentes.

2007

PCR digital

Aumentan de manera significativa publicaciones empleando dPCR

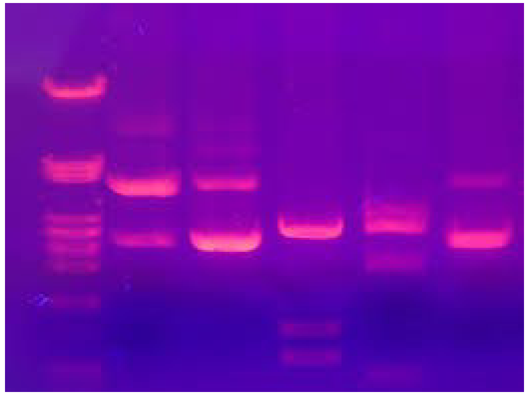
2022

Validación MON810 dPCR

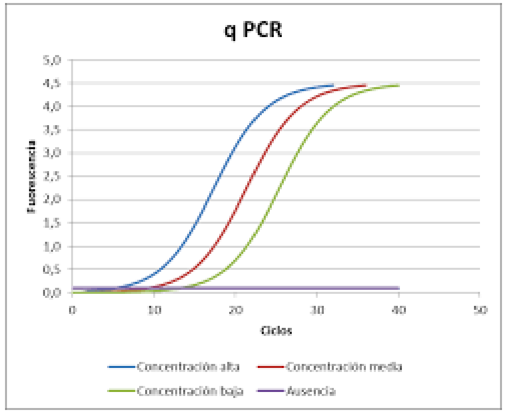
LRUE valida cuantificación de MON810 por dPCR

01. Recorrido de la PCR. 3 Generaciones.

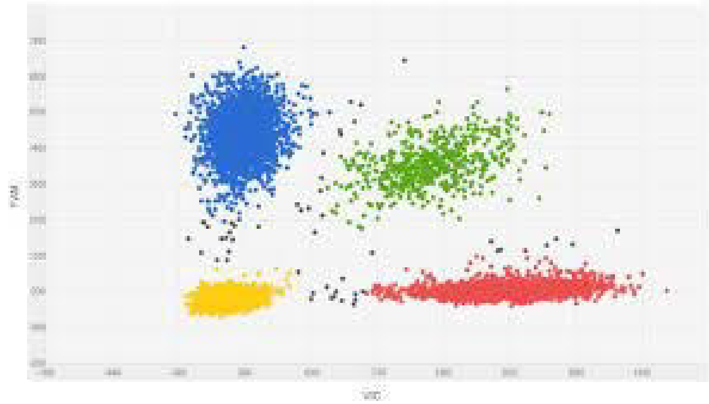
1



2



3



SUMARIO

01

Recorrido PCR. 3 Generaciones

02

Fundamento de la PCR digital

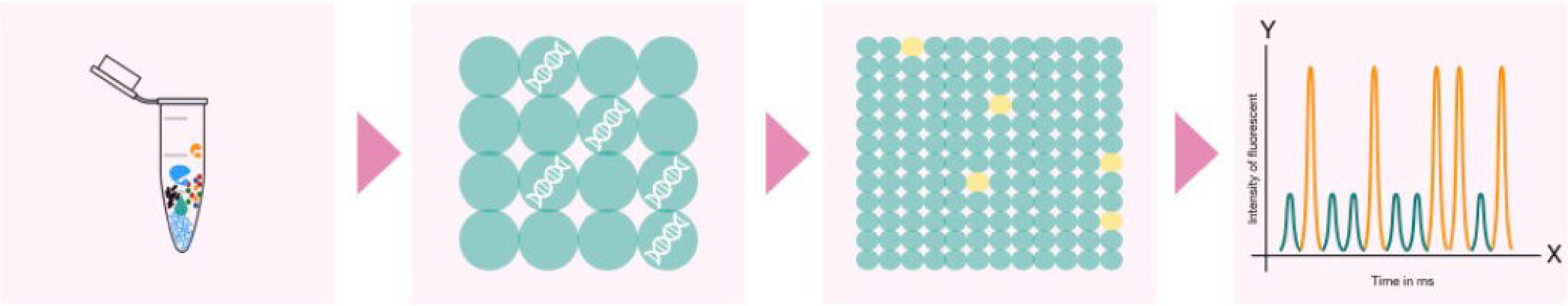
03

ddPCR en el análisis de OMGs

04

Actualidad y retos del CNA en ddPCR

02. Fundamento de la PCR digital.



Subdivisión de la muestra. Diferente en función de ddPCR o cdPCR

Cada nanogota puede albergar ninguna, una o varias moléculas de ADN diana

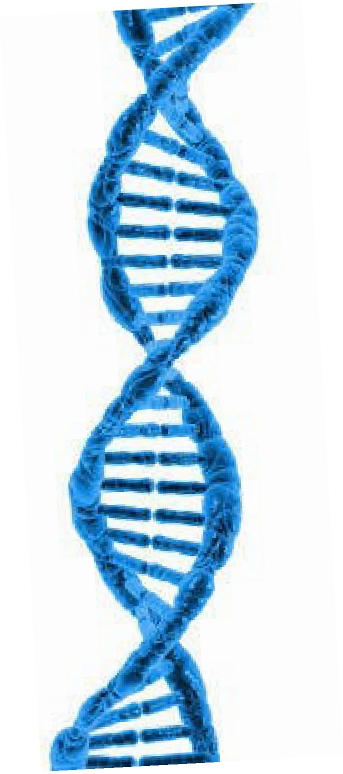
Amplificación mediante PCR convencional

Detección y cuantificación. Distribución de Poisson

02. Fundamento de la PCR digital.

VENTAJAS

- ✓ No necesita curva patrón
- ✓ Medida a punto final (0 ó 1)
- ✓ Más precisión, más sensibilidad
- ✓ Más tolerante a inhibidores



ALGUNAS APLICACIONES

- ✓ Variación en el número de copias (CNV)
- ✓ Detección de secuencias raras
- ✓ Expresión génica y análisis de microARNs
- ✓ **Detección y cuantificación de OMGs**

SUMARIO

01

Recorrido PCR. 3 Generaciones

02

Fundamento de la PCR digital

03

ddPCR en el análisis de OMGs

04

Actualidad y retos del CNA en ddPCR

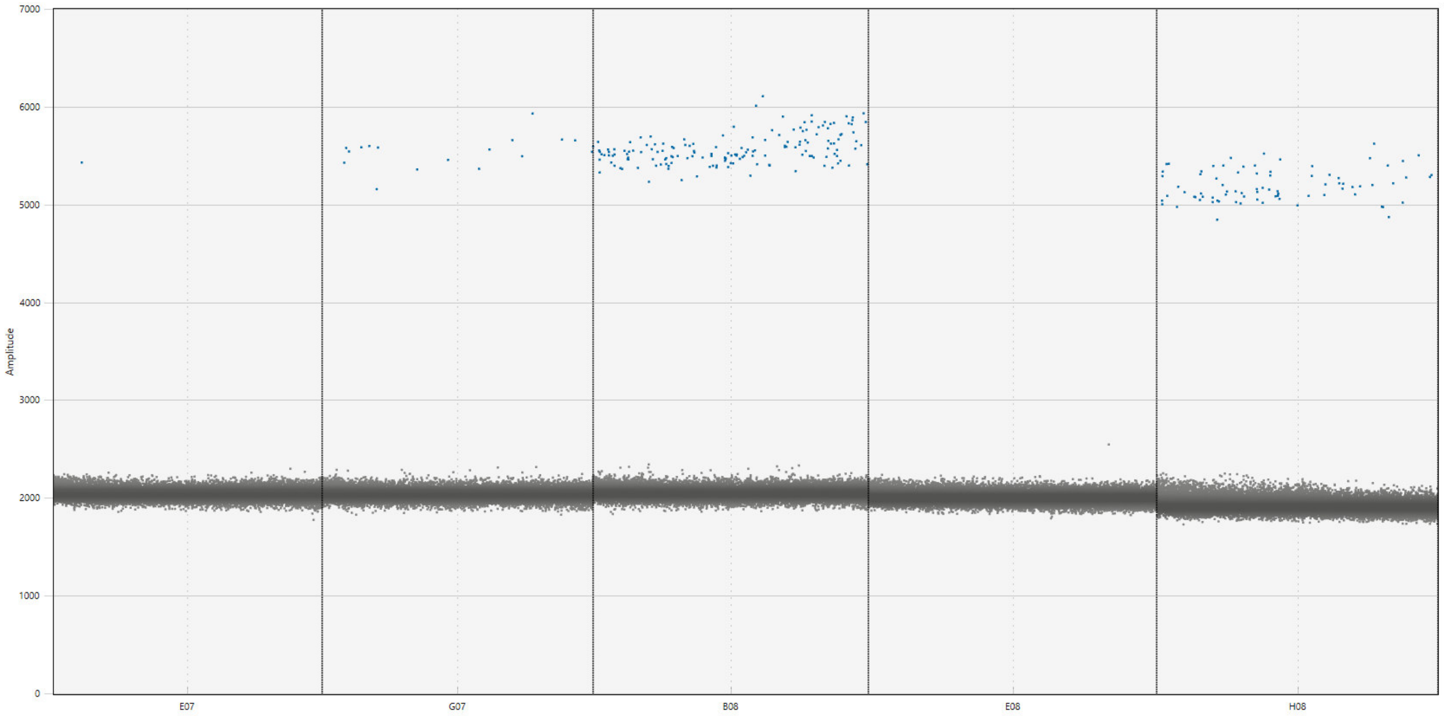
03. ddPCR en el análisis de OMGs.

Cuantificación relativa
- Endógeno (Ej: hmgA)
- Transgénico (Ej: MON 810)

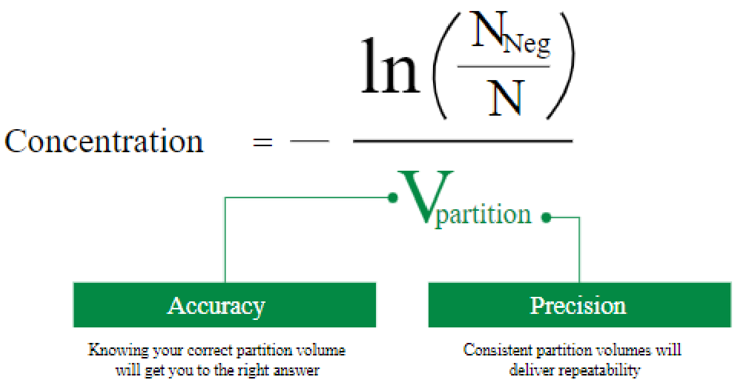
→ Simplex o dúplex

BIO-RAD
Automated Droplet Generator
C1000 Touch Thermal Cycler
BIO-RAD
QX600 Droplet Reader

03. ddPCR en el análisis de OMGs.



MON 810 0% MON 810 0,1% MON 810 1% M negativa M positiva



$$\text{Concentration} = -\frac{\ln\left(\frac{N_{Neg}}{N}\right)}{V_{partition}}$$

Accuracy

Knowing your correct partition volume will get you to the right answer

Precision

Consistent partition volumes will deliver repeatability

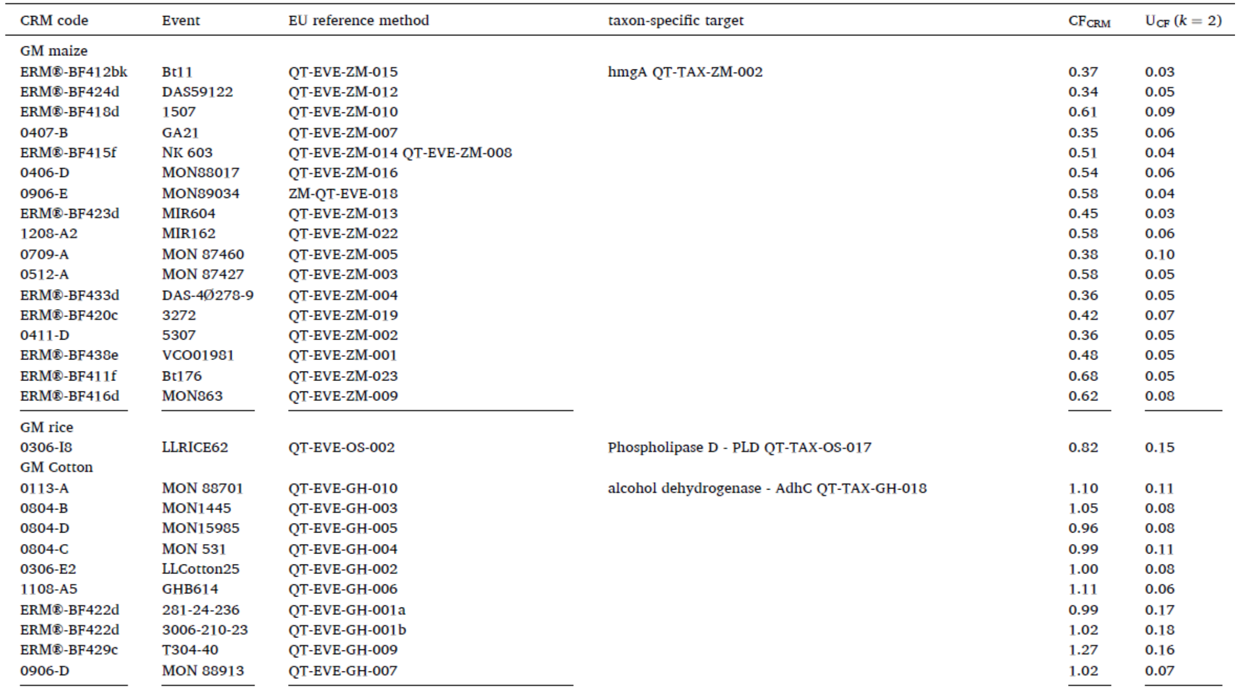
03. ddPCR en el análisis de OMGs.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS ddPCR → N.º de copias o masa

$$w_{CRM} = \frac{m_{GM}}{m_{GM} + m_{nonGM}} \times 1000$$

$$CF_{CRM} = \frac{cp_T}{cp_E} \times \frac{1}{w_{CRM}} \times 1000$$

Obtenido de Corbisier *et al*. (2022)



CRM code	Event	EU reference method	taxon-specific target	CF_{CRM}	U_{CF} ($k = 2$)
GM maize					
ERM®-BF412bk	Bt11	QT-EVE-ZM-015	hmgA QT-TAX-ZM-002	0.37	0.03
ERM®-BF424d	DAS59122	QT-EVE-ZM-012		0.34	0.05
ERM®-BF418d	1507	QT-EVE-ZM-010		0.61	0.09
0407-B	GA21	QT-EVE-ZM-007		0.35	0.06
ERM®-BF415f	NK 603	QT-EVE-ZM-014 QT-EVE-ZM-008		0.51	0.04
0406-D	MON88017	QT-EVE-ZM-016		0.54	0.06
0906-E	MON89034	ZM-QT-EVE-018		0.58	0.04
ERM®-BF423d	MIR604	QT-EVE-ZM-013		0.45	0.03
1208-A2	MIR162	QT-EVE-ZM-022		0.58	0.06
0709-A	MON 87460	QT-EVE-ZM-005		0.38	0.10
0512-A	MON 87427	QT-EVE-ZM-003		0.58	0.05
ERM®-BF433d	DAS-40278-9	QT-EVE-ZM-004		0.36	0.05
ERM®-BF420c	3272	QT-EVE-ZM-019		0.42	0.07
0411-D	5307	QT-EVE-ZM-002		0.36	0.05
ERM®-BF438e	VCO01981	QT-EVE-ZM-001		0.48	0.05
ERM®-BF411f	Bt176	QT-EVE-ZM-023		0.68	0.05
ERM®-BF416d	MON863	QT-EVE-ZM-009		0.62	0.08
GM rice					
0306-I8	LLRICE62	QT-EVE-OS-002	Phospholipase D - PLD QT-TAX-OS-017	0.82	0.15
GM Cotton					
0113-A	MON 88701	QT-EVE-GH-010	alcohol dehydrogenase - AdhC QT-TAX-GH-018	1.10	0.11
0804-B	MON1445	QT-EVE-GH-003		1.05	0.08
0804-D	MON15985	QT-EVE-GH-005		0.96	0.08
0804-C	MON 531	QT-EVE-GH-004		0.99	0.11
0306-E2	LLCotton25	QT-EVE-GH-002		1.00	0.08
1108-A5	GHB614	QT-EVE-GH-006		1.11	0.06
ERM®-BF422d	281-24-236	QT-EVE-GH-001a		0.99	0.17
ERM®-BF422d	3006-210-23	QT-EVE-GH-001b		1.02	0.18
ERM®-BF429c	T304-40	QT-EVE-GH-009		1.27	0.16
0906-D	MON 88913	QT-EVE-GH-007		1.02	0.07

SUMARIO

01

Recorrido PCR. 3 Generaciones

02

Fundamento de la PCR digital

03

ddPCR en el análisis de OMGs

04

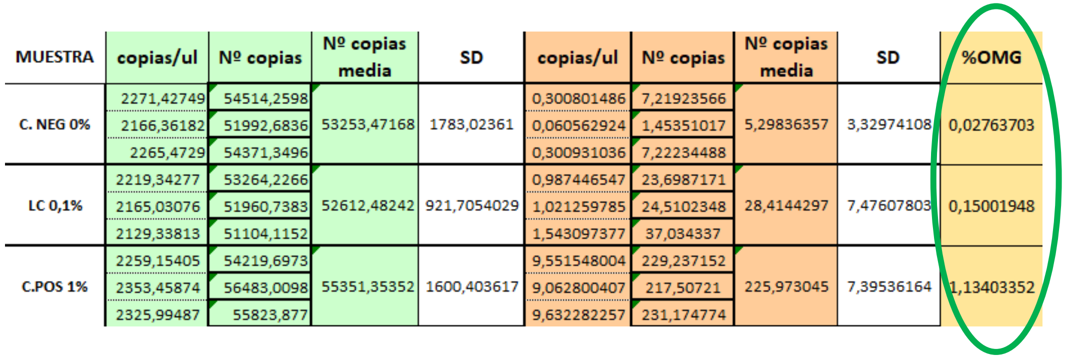
Actualidad y retos del CNA en ddPCR

04. Actualidad y retos del CNA en ddPCR

Proceso formativo → Curso BIO RAD y lectura de manuales y bibliografía.

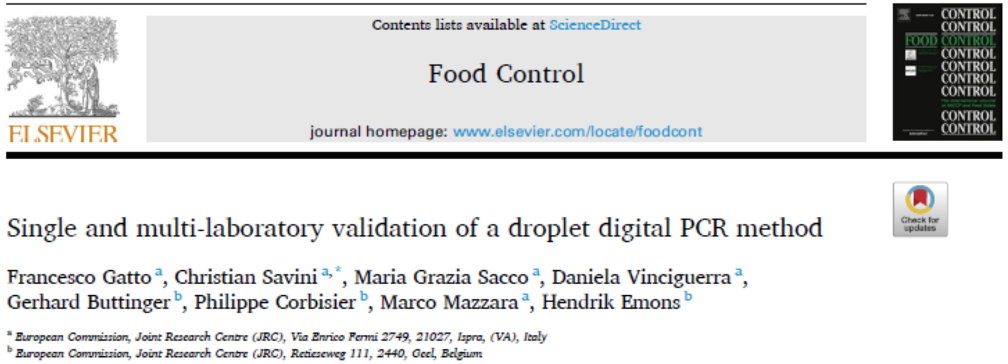
Puesta a punto del equipo: Flujo de trabajo y rutina de análisis → Redacción de PNT para equipo: **Utilización y mantenimiento del equipo de PCR digital QX600 AutoDG**

Análisis de materiales de referencia y muestras de control →



MUESTRA	copias/ul	Nº copias	Nº copias media	SD	copias/ul	Nº copias	Nº copias media	SD	%OMG
C. NEG 0%	2271,42749	54514,2598	53253,47168	1783,02361	0,300801486	7,21923566	5,29836357	3,32974108	0,02763703
	2166,36182	51992,6836			0,060562924	1,45351017			
	2265,4729	54371,3496			0,300931036	7,22234488			
LC 0,1%	2219,34277	53264,2266	52612,48242	921,7054029	0,987446547	23,6987171	28,4144297	7,47607803	0,15001948
	2165,03076	51960,7383			1,021259785	24,5102348			
	2129,33813	51104,1152			1,543097377	37,034337			
C.POS 1%	2259,15405	54219,6973	55351,35352	1600,403617	9,551548004	229,237152	225,973045	7,39536164	1,13403352
	2353,45874	56483,0098			9,062800407	217,50721			
	2325,99487	55823,877			9,632282257	231,174774			

04. Actualidad y retos del CNA en ddPCR



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

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

Single and multi-laboratory validation of a droplet digital PCR method

Francesco Gatto[a], Christian Savini[a,*], Maria Grazia Sacco[a], Daniela Vinciguerra[a], Gerhard Buttinger[b], Philippe Corbisier[b], Marco Mazzara[a], Hendrik Emons[b]

[a] European Commission, Joint Research Centre (JRC), Via Enrico Fermi 2749, 21027, Ispra, (VA), Italy

[b] European Commission, Joint Research Centre (JRC), Retieseweg 111, 2440, Geel, Belgium

Validación MON 810

y… en un futuro
muchos más eventos

Determinación cuantitativa de Organismos Modificados Genéticamente autorizados en la UE para su utilización como alimentos y/o piensos mediante **PCR digital**.

ENAC
Entidad Nacional de Acreditación

Detección e identificación cualitativa de Organismos Modificados Genéticamente autorizados en la UE para su utilización como
alimentos y/o piensos mediante **PCR digital**

MUCHAS GRACIAS

50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

Cuidando de ti
desde el laboratorio

Centro
Nacional de
Alimentación

MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición