



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

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



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

01. Recorrido de la PCR. 3 Generaciones.



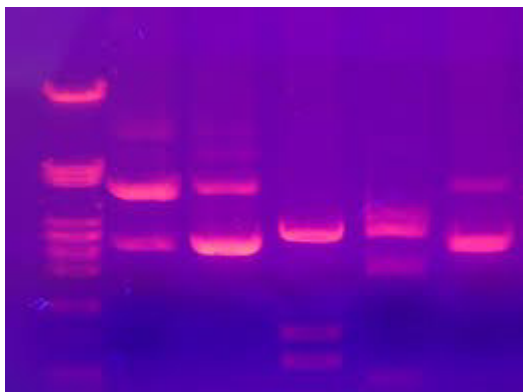
MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



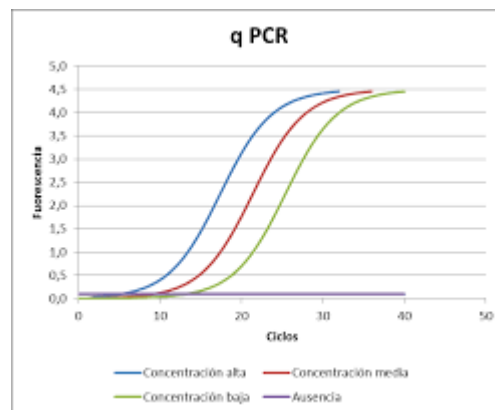
50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

01. Recorrido de la PCR. 3 Generaciones.

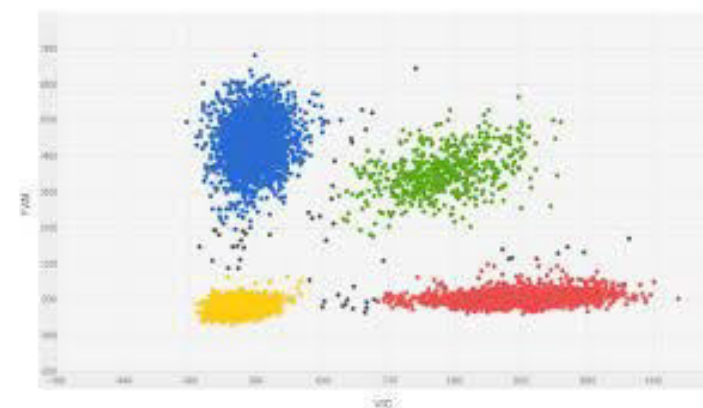
1



2



3



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



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



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030

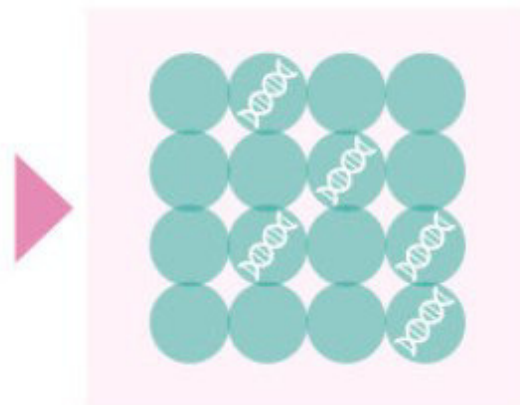


50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

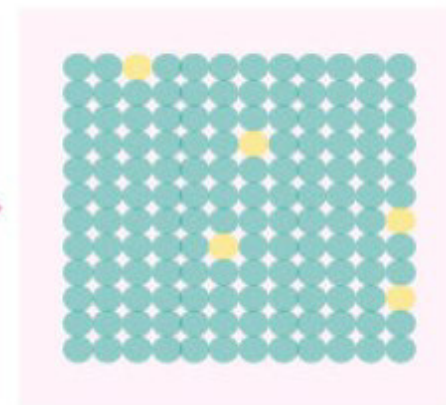
02. Fundamento de la PCR digital.



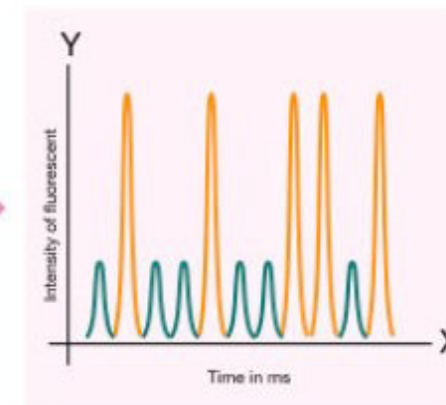
Subdivisión de la muestra. Diferente en función de ddPCR o cdPCR



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



Amplificación mediante PCR convencional



Detección y cuantificación. Distribución de Poisson



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

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



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

03. ddPCR en el análisis de OMGs.

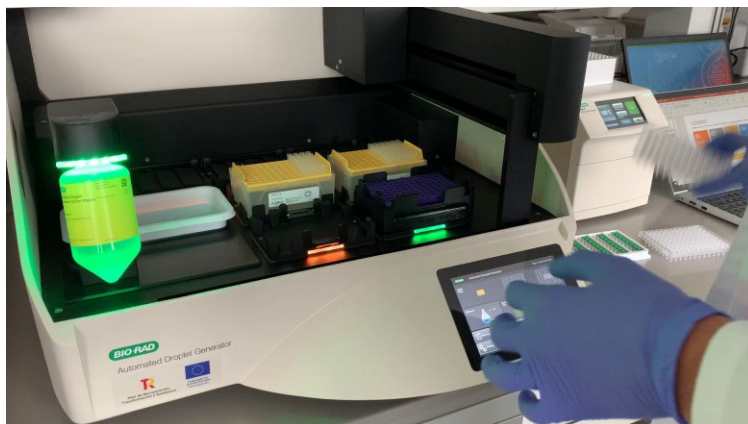
Cuantificación relativa

Endógeno (Ej: hmgA)

Transgénico (Ej: MON 810)



Simplex o dúplex

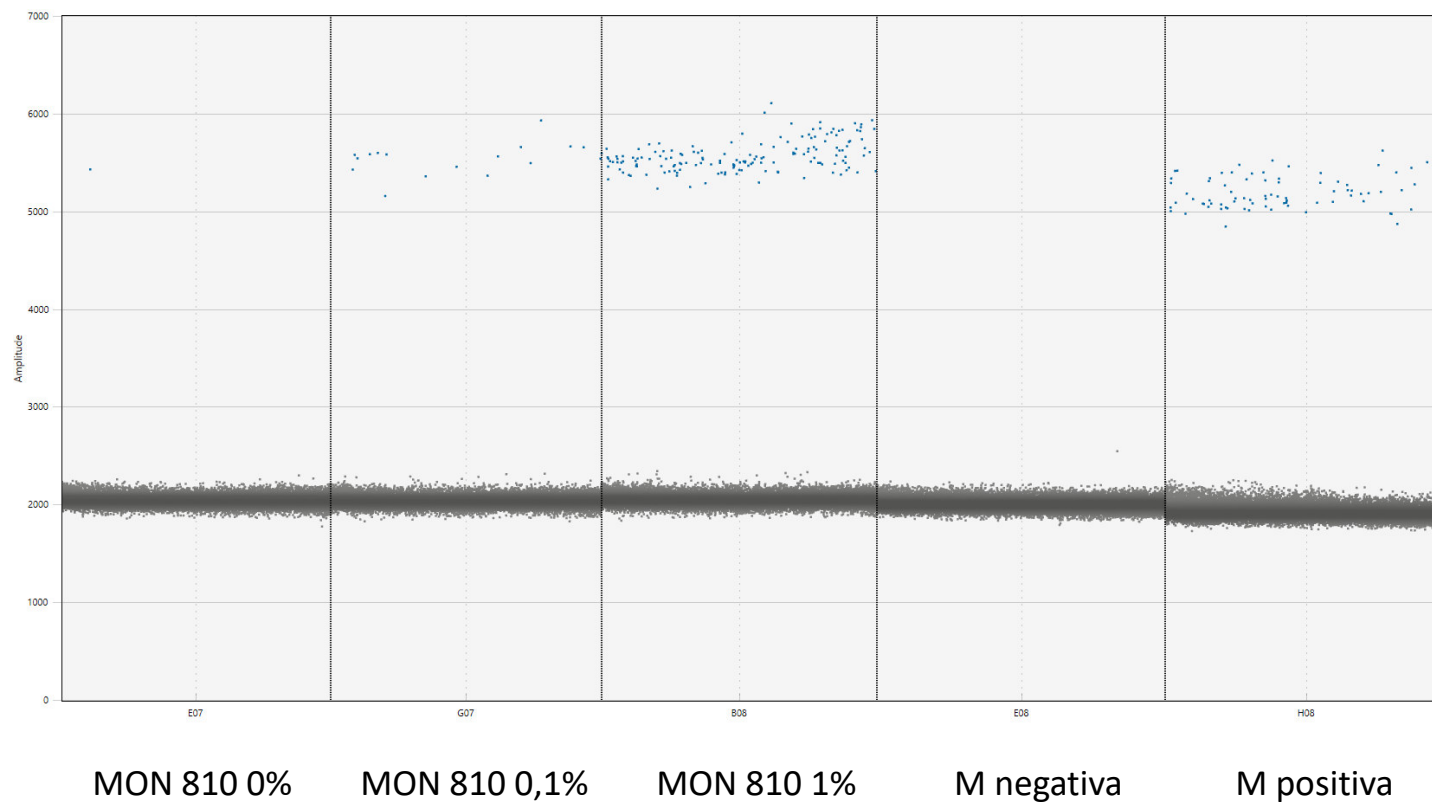


MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

03. ddPCR en el análisis de OMGs.



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

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

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

$$CF_{CRM} = \frac{c_{PT}}{c_{PE}} \times \frac{1}{w_{CRM}} \times 1000$$

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



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



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



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

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			



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN

04. Actualidad y retos del CNA en ddPCR



Validación MON 810

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



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**.



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



MINISTERIO
DE DERECHOS SOCIALES, CONSUMO
Y AGENDA 2030



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición



Centro
Nacional de
Alimentación



**50 ANIVERSARIO
CENTRO NACIONAL
DE ALIMENTACIÓN**

*Cuidando de ti
desde el laboratorio*