

Factores que influyen en la cuantificación de GMOs: impacto de la matriz, métodos de extracción y plataforma de PCR

Francisco Mayo León

Scientific officer, F5 Unit, JRC-Geel (European Commission)

Jornadas de referencia, Majadahonda, 11 Junio 2026

JRC - JRC-Geel

- **Generación de conocimiento** basado en evidencias para **apoyar las políticas** de la Union Europea (UE) y **contribuir positivamente** a la Sociedad
- **JRC Geel: excelencia en ciencias de la medición**
 - Métodos, materiales y tecnologías avanzadas
 - Mediciones fiables y trazables
 - Aplicaciones en seguridad alimentaria, salud, **biotecnología** y seguridad nuclear



Unidad F5 - EURL

Misión de F.5

Proporcionar metodos de medicion fiables

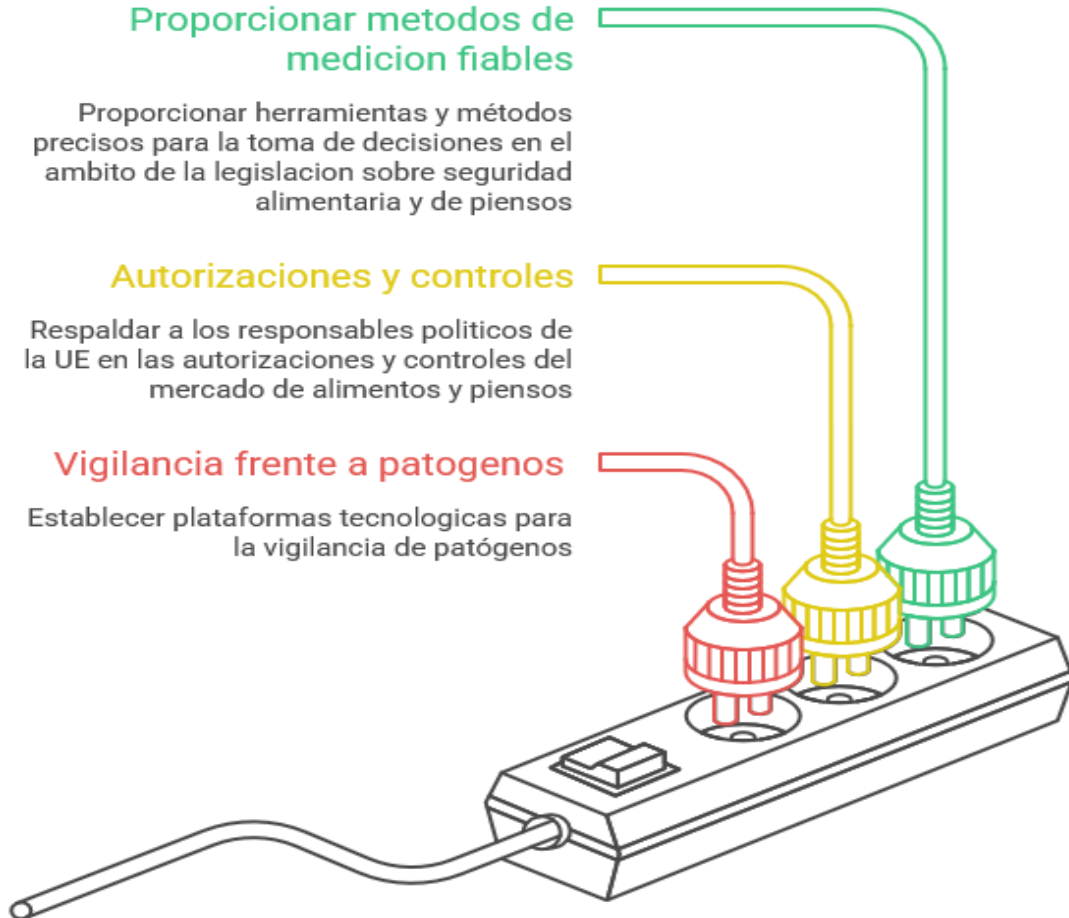
Proporcionar herramientas y métodos precisos para la toma de decisiones en el ambito de la legislacion sobre seguridad alimentaria y de piensos

Autorizaciones y controles

Respaldar a los responsables politicos de la UE en las autorizaciones y controles del mercado de alimentos y piensos

Vigilancia frente a patogenos

Establecer plataformas tecnologicas para la vigilancia de patógenos



- 4 equipos, 3 Laboratorios de Referencia Europeos:
- ✓ Bioanalysis (**EURL for GM Food and Feed*** and Pathogen surveillance)
 - ✓ Feed (EURL for Feed Additives)
 - ✓ Food Contact Materials (EURL for FCMs)
 - ✓ Standardisation / Allergens

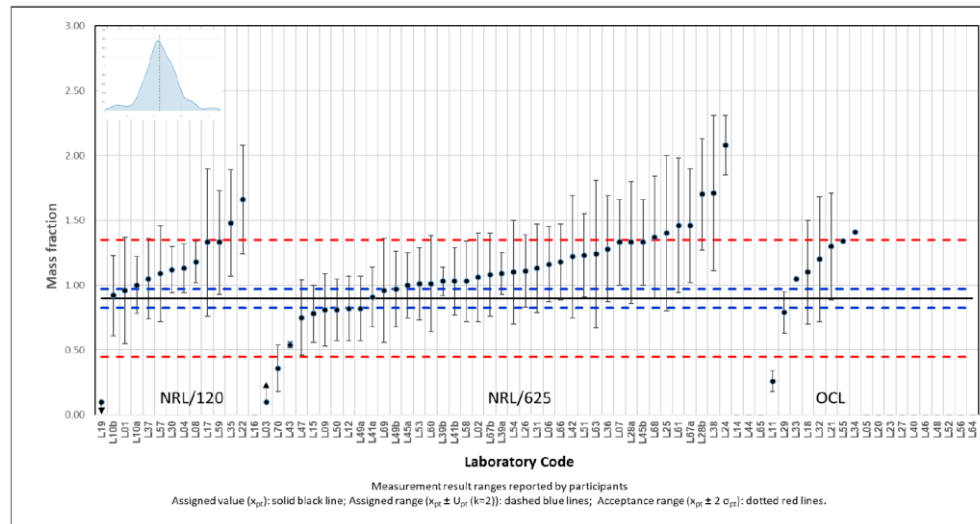
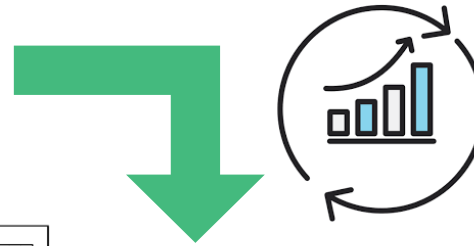
*Con laboratorios en Ispra (Italia) y Geel (Belgica)



Ursula Vincent
(F5 Head of Unit)

Proficiency Tests ~ ISO/IEC 17043:2023

- Organizados desde JRC-Geel: **2 rondas anuales desde 2010** con 1-2 test items por año (alimentos y piensos)
- 1) **Evaluación** de los laboratorios + 2) Aspectos **educacionales** + 3) **Apoyo** ante resultados insatisfactorios



(Resultados del ejercicio GMFF 25/02 proficiency test on maize flour)

Food Control 114 (2020) 107237



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Food Control

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



Ten years of proficiency testing reveals an improvement in the analytical performance of EU National Reference Laboratories for genetically modified food and feed

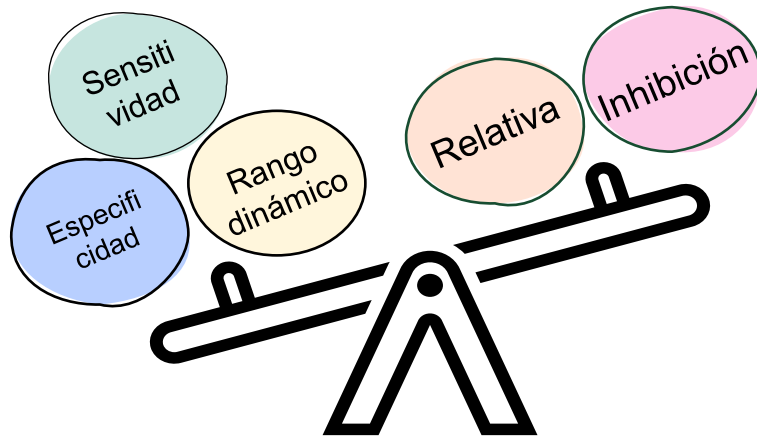
Wim Broothaerts*, Fernando Cordeiro, Piotr Robouch, Hendrik Emons

European Commission, Joint Research Centre (JRC), Geel, Belgium

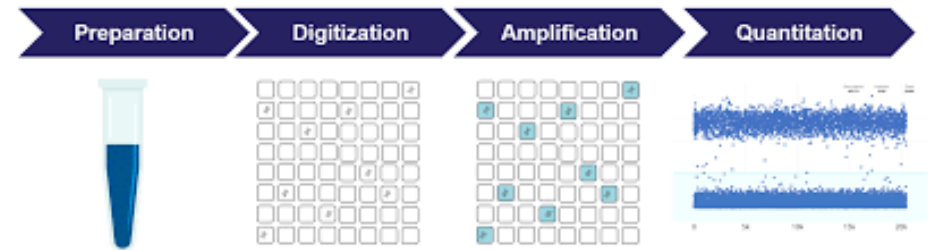


qPCR y dPCR en la detección y cuantificación de GMOs

- **EURL GMFF:** Métodos analíticos para NRLs y OCLs
- **qPCR:** método *Gold standard* en análisis de GMOs

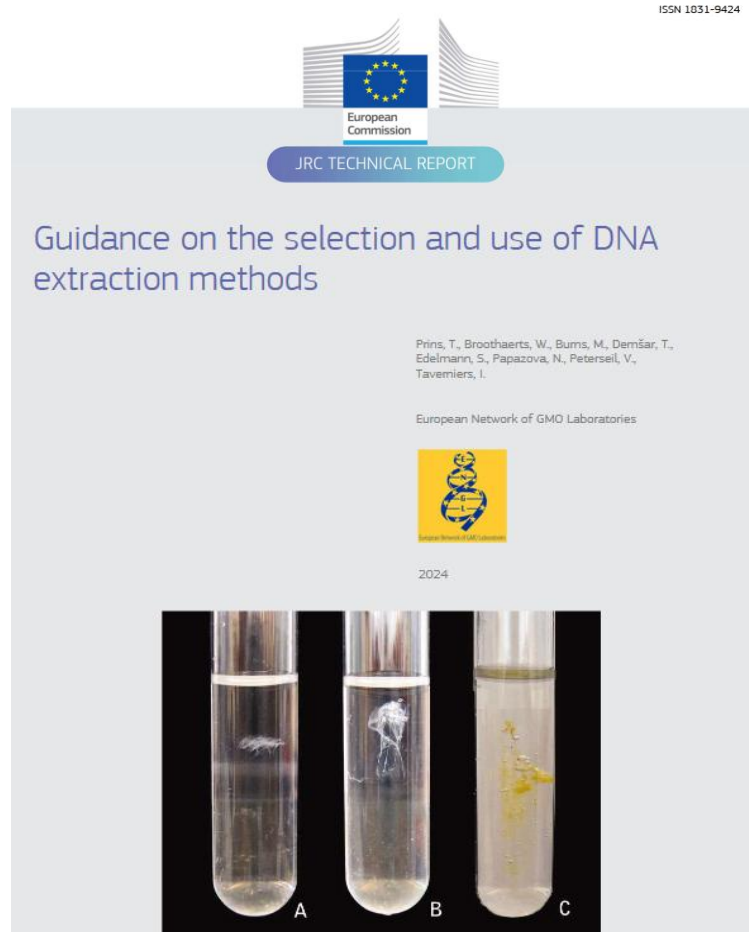


- Fundamento de la **PCR digital (dPCR)**

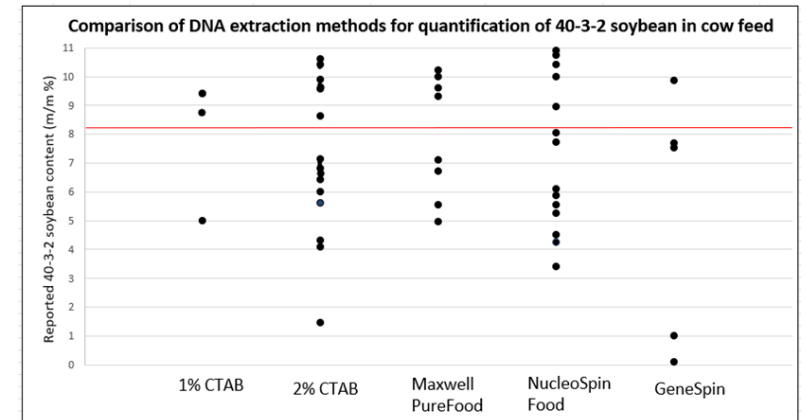
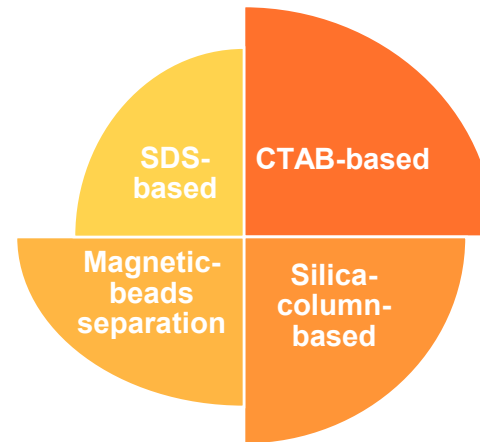


- **Tolerancia a inhibidores** (Matrices complejas)
- **Cuantificación absoluta** (no CRMs)
- Mayor **exactitud** y **sensibilidad**
- **Robustez** y **precisión** mejoradas
- **Fácil transferibilidad** de qPCR a dPCR

Extracción de ADN: métodos y matrices



- Métodos más comunes:



(GMFF 25/01 proficiency test on cow feed material)

- Heterogeneidad de los métodos utilizados por los laboratorios participantes en los PT del EURL
- Variabilidad en la composición de las matrices (grasas, polisacáridos y proteínas)

Estudio piloto: Proficiency test items (2019-2024)



- 1) Test de viabilidad del análisis de matrices complejas por PCR digital
- 2) Evaluar y comparar los resultados obtenidos en 3 plataformas diferentes de PCR digital (Biomark - QX600 –QIAcuity)

Soya



Animal feed (EURL
GMFF PT 19/02)

40-3-2
MON87708



Meat pâté (EURL
GMFF PT 21/02)

MON89788



Tofu (EURL GMFF
PT 24/01)

A2704



Soya protein concentrate
(EURL GMFF PT 24/02)

MON87708

Maize



Maize flour (EURL
GMFF PT 21/02)

T25



Multicereal bread (EURL
GMFF PT 22/02)

DAS59122



Maize popcorn (EURL
GMFF PT 23/01)

MIR604



Milled pasta (EURL
GMFF PT 23/02)

1507



Cornflakes (EURL
GMFF PT 24/02)

MON89034

Rapeseed



Rapeseed meal (EURL
GMFF PT 22/01)

MS8
RF3

Cotton

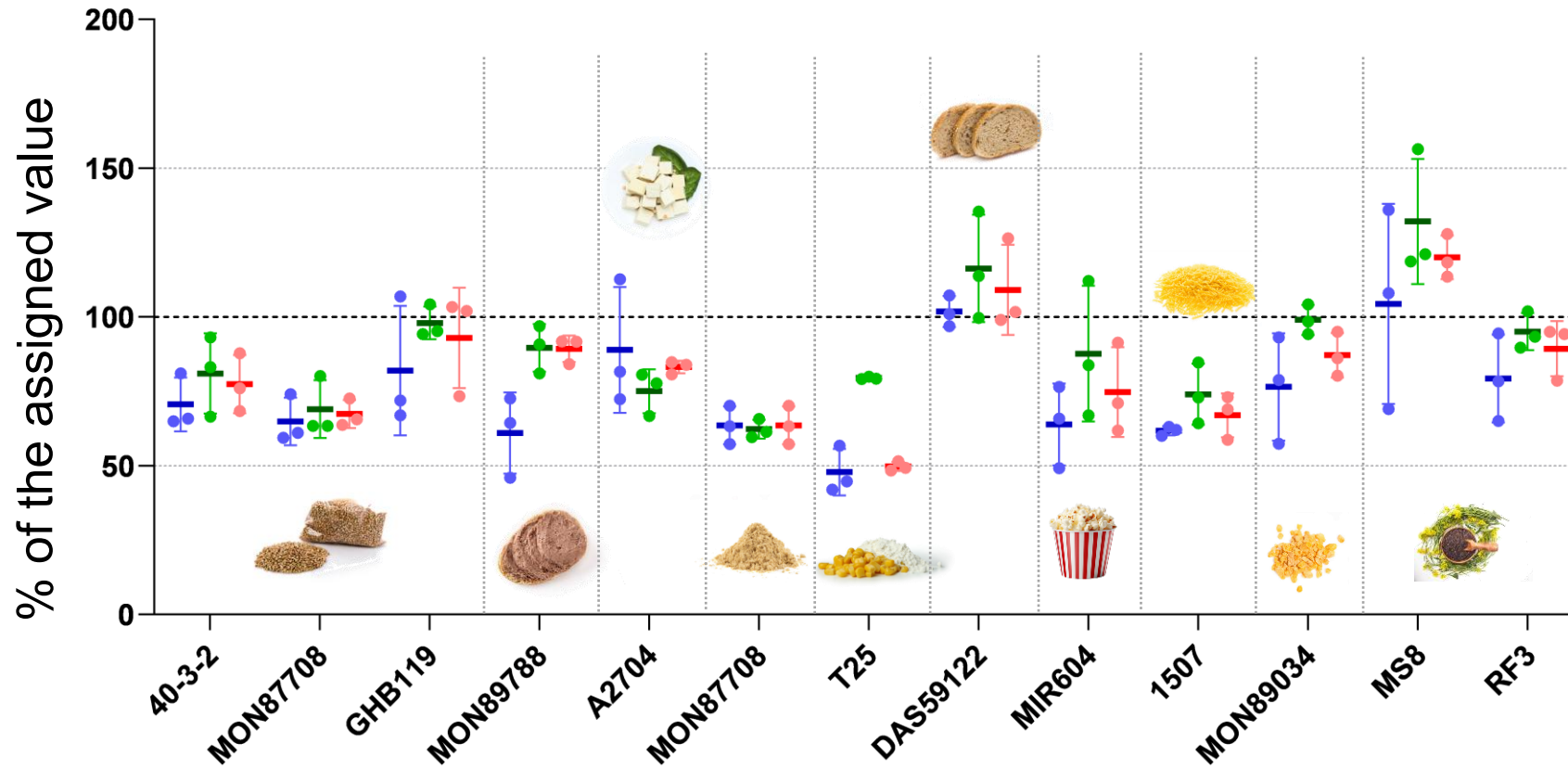


Animal feed (GMFF
PT 19/02)

GHB119

**Extracción
con método
propio
CTAB**

Estudio piloto: Resultados



Biomark (Fluidigm)



QX600 (BioRad)



QIAcuity (QIAGEN)

Estudio piloto: Resultados



- La PCR digital (dPCR) es utilizada cada vez con mayor frecuencia por los participantes en los ensayos de aptitud (PT)



- Adquisición reciente de un sistema automatizado de extracción de ADN (Maxwell® RSC 48 Instrument, Promega)



- Muchos participantes en nuestros ensayos de aptitud utilizan sistemáticamente el mismo método de extracción de ADN, a pesar de que las matrices alimentarias o de piensos son muy diferentes

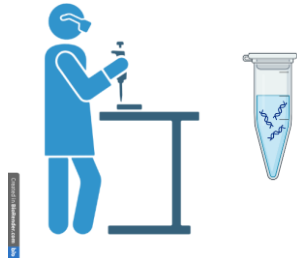


- Para las mediciones realizadas en los ítems de los ensayos de aptitud, normalmente utilizamos métodos de extracción basados en CTAB

Objetivo

Evaluar el efecto de diferentes **métodos de extracción de ADN** en **distintos tipos de matrices** alimentarias y de piensos, y comparar la **qPCR** con la **dPCR** utilizando dos **plataformas de PCR digital** (basada en droplets y basada en particiones sólidas)

Mat. & Métodos



1. Extracción de ADN

Métodos empleados (n=3):

- CTAB (método propio)
- Extracción automatizada RSC Maxwell (Promega)
- Nucleospin Food kit (Macherey-Nagel)

- Ricas en carbohidratos

Maiz / Soja / Colza



Maize flour (EURL GMFF PT 21/02)

T25



Multicereal bread (EURL GMFF PT 22/02)

DAS59122

- Ricas en grasas



Meat pâté (EURL GMFF PT 21/02)

MON89788



Rapeseed meal (EURL GMFF PT 22/01)

**MS8
RF3**

- Ricas en proteínas



Tofu (EURL GMFF PT 24/01)

A2704



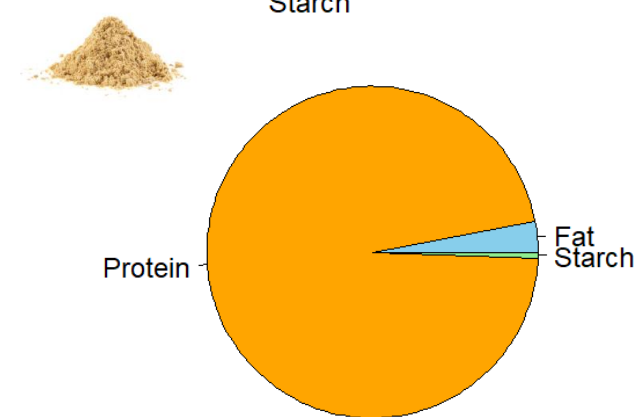
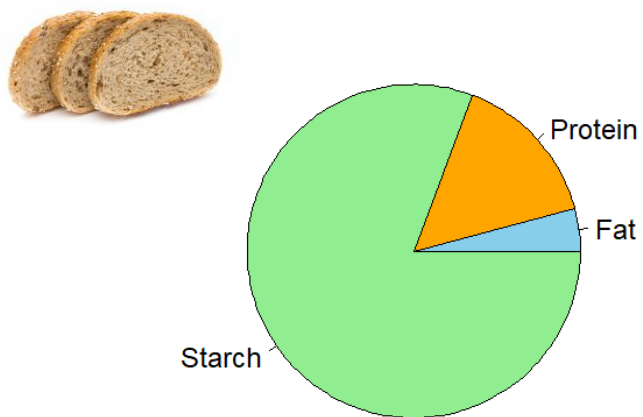
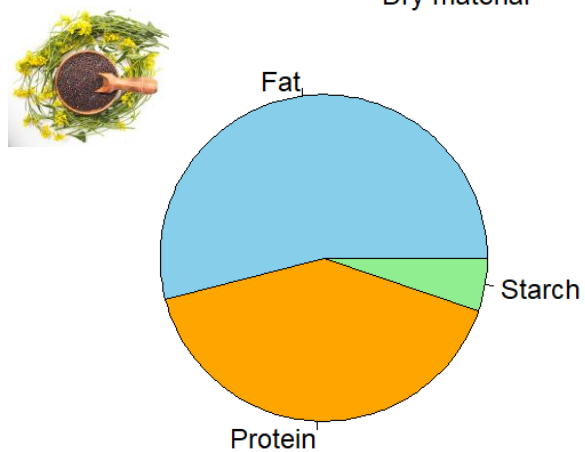
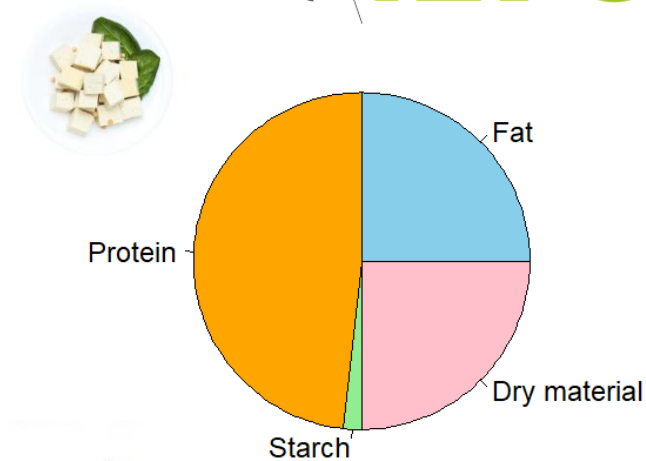
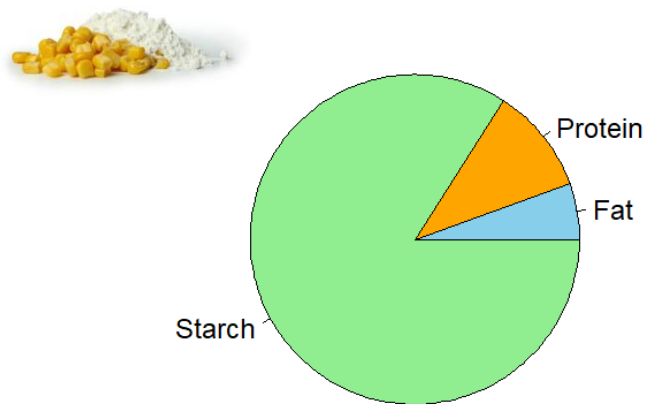
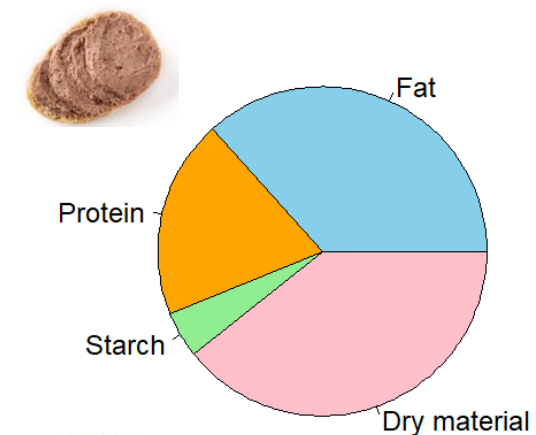
Soya protein concentrate (EURL GMFF PT 24/02)

MON87708

Mat. & Metodos



Resultados: Análisis nutricional



Resultados: Extracción de ADN



CTAB method				Maxwell automated extraction				Nucleospin method			
DNA extraction yield by Nanodrop (ng/mg)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	DNA extraction yield by Picogreen (ng/mg)	DNA extraction yield by Nanodrop (ng/mg)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	DNA extraction yield by Picogreen (ng/mg)	DNA extraction yield by Nanodrop (ng/mg)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	DNA extraction yield by Picogreen (ng/mg)
73	1.86	2.14	59	227	2.07	2.27	41	94	1.86	2.17	85
68	1.87	2.31	44	260	2.07	2.18	44	75	1.84	2.20	57
77	1.87	2.25	67	279	2.08	2.18	45	86	1.84	2.10	77
172	1.89	2.30	138	396	1.97	1.78	47	57	1.86	1.91	32
170	1.90	2.27	131	457	1.99	1.91	75	60	1.87	1.92	31
162	1.89	2.31	119	433	1.98	1.91	77	35	1.87	2.12	25
117	1.92	2.38	41	275	1.97	1.79	194	28	1.86	2.08	25
145	1.90	2.39	105	262	1.90	1.45	234	24	1.88	1.83	23
125	1.89	2.41	98	252	1.92	1.45	181	24	1.87	2.03	22
431	1.94	2.38	136	663	1.97	2.02	363	440	1.90	2.15	333
341	1.99	2.40	104	638	2.00	2.04	356	311	1.90	2.12	244
339	1.92	2.39	140	598	2.00	2.12	319	274	1.90	2.19	193

Evaluation of the DNA purity: 1) Ratio A260/A280 $\geq$ 1.8 2) Ratio A260/A230 $\geq$ 2.0

Resultados: Extracción de ADN



CTAB method				Maxwell automated extraction				Nucleospin method			
DNA extraction yield by Nanodrop (ng/mg)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	DNA extraction yield by Picogreen (ng/mg)	DNA extraction yield by Nanodrop (ng/mg)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	DNA extraction yield by Picogreen (ng/mg)	DNA extraction yield by Nanodrop (ng/mg)	Ratio 260/280	Ratio 260/230	DNA extraction yield by Picogreen (ng/mg)
26	1.96	2.32	1.4	59	1.59	0.82	0.4	21	1.78	0.88	<LOQ
9	1.96	1.93	<LOQ	48	1.68	0.91	<LOQ	24	1.70	0.72	<LOQ
10	1.91	2.12	0.1	37	1.73	1.28	<LOQ	22	1.69	0.70	<LOQ
168	2.00	2.43	4	661	2.08	2.17	93	193	2.00	1.81	20
151	1.99	2.40	3	662	2.05	2.12	96	403	2.06	1.95	50
172	2.00	2.43	5	600	2.06	2.11	63	474	2.07	2.04	47

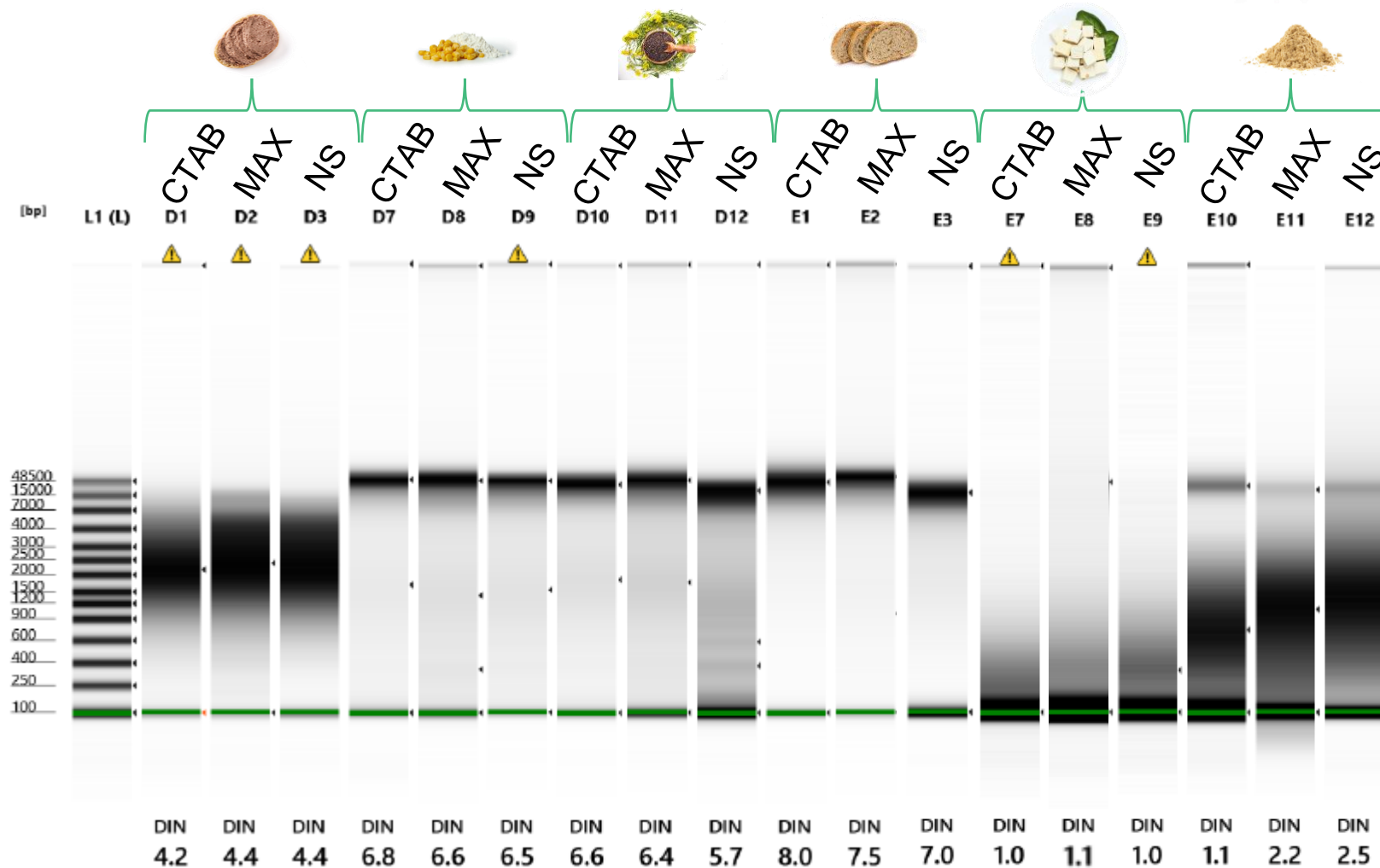
Evaluation of the DNA purity:

- 1) Ratio A260/A280 ≥ 1.8
- 2) Ratio A260/A230 ≥ 2.0

Resultados: Integridad del ADN



4200 Tapestation
System



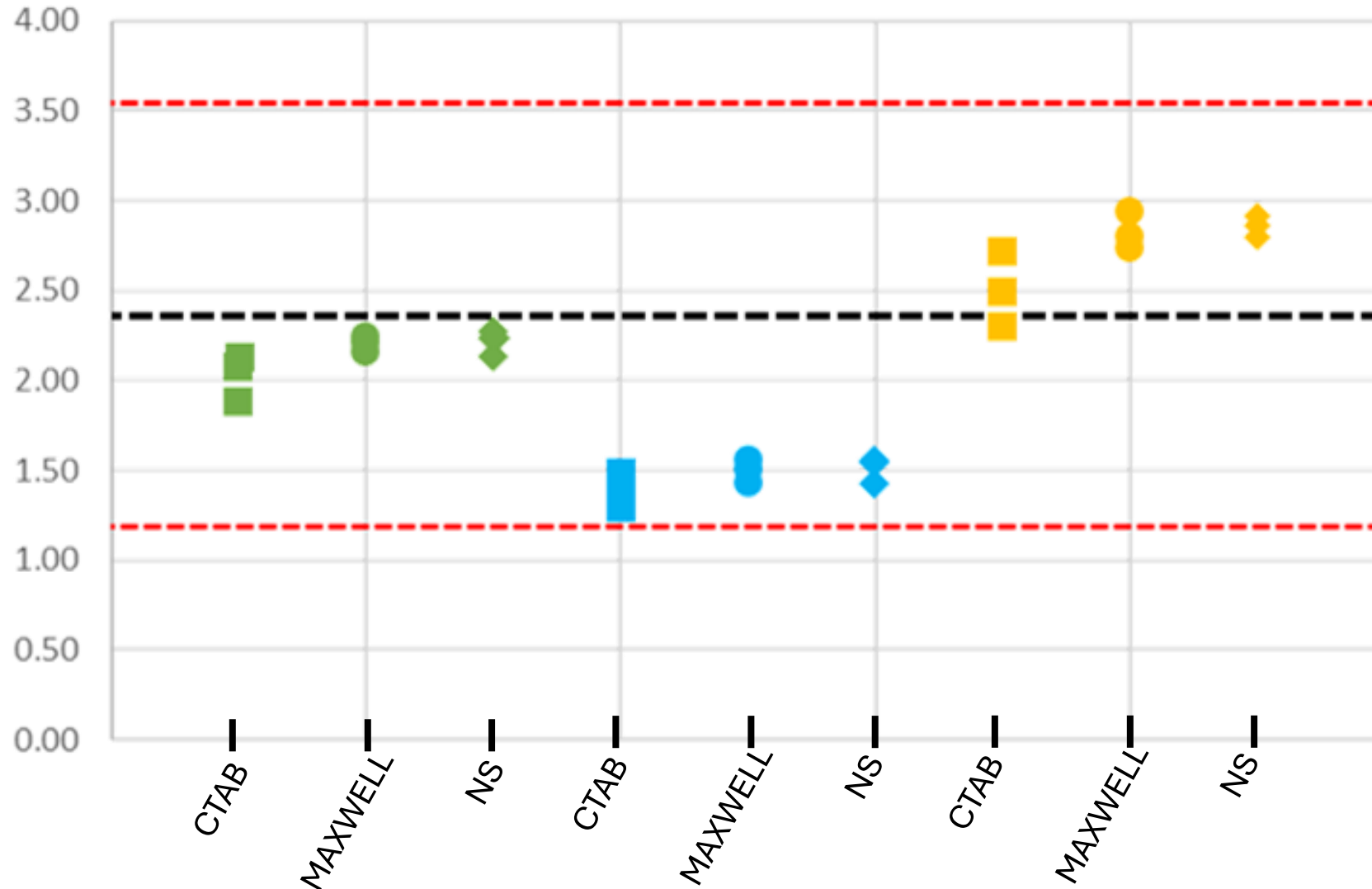
Resultados: Tests de inhibición (endogene)

		CTAB method	Maxwell automated extraction	Nucleospin method
	Maize bread (<i>hmg</i>)	✓	✓	✓
	Maize flour (<i>hmg</i>)	✓	✓	✓
	Meat pâté (<i>lec1</i>)	✓	✓	✓
	Rapeseed meal (<i>fatA</i>)	✓	✓	✗
	Tofu (<i>lec1</i>)	✓	✓	✓
	Soy protein concentrate (<i>lec1</i>)	✓	✓	✓

Maize flour (spiked with event T25)



Result % (m/m)



Digital
droplet PCR

QIAcuity

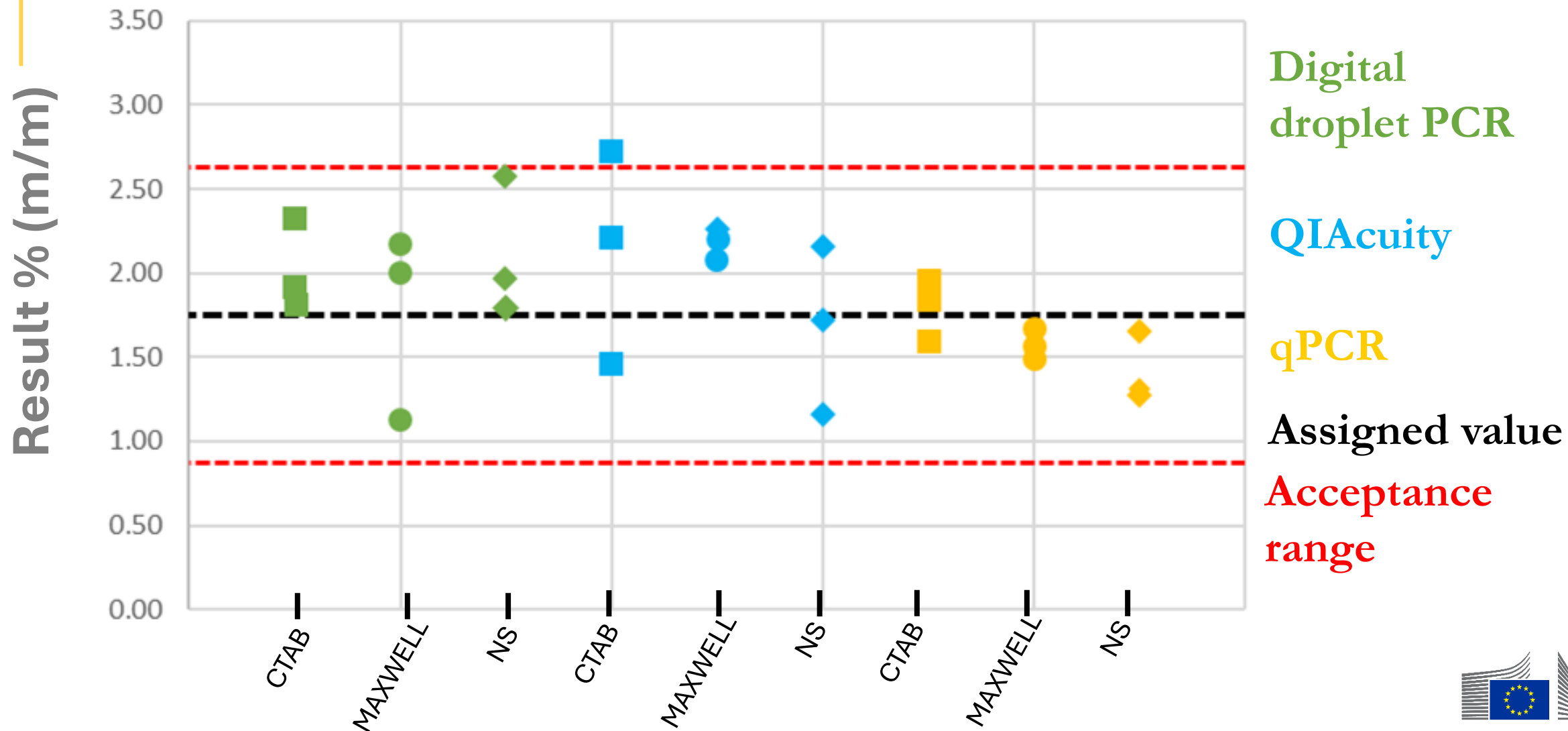
qPCR

Assigned value

Acceptance
range



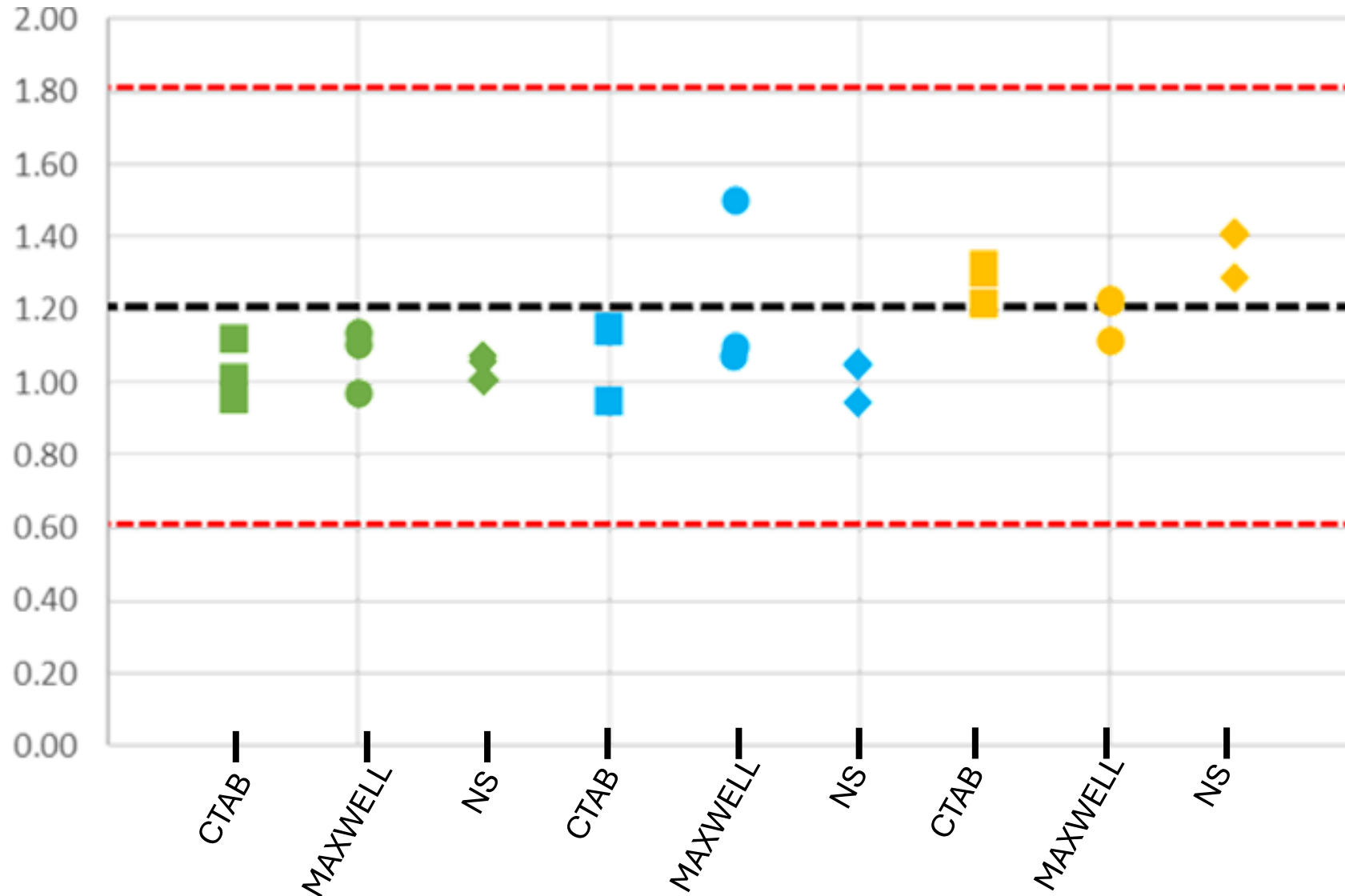
Maize bread (spiked with event 59122)



Rapeseed meal (spiked with event RF3)



Result % (m/m)



Digital
droplet PCR

QIAcuity

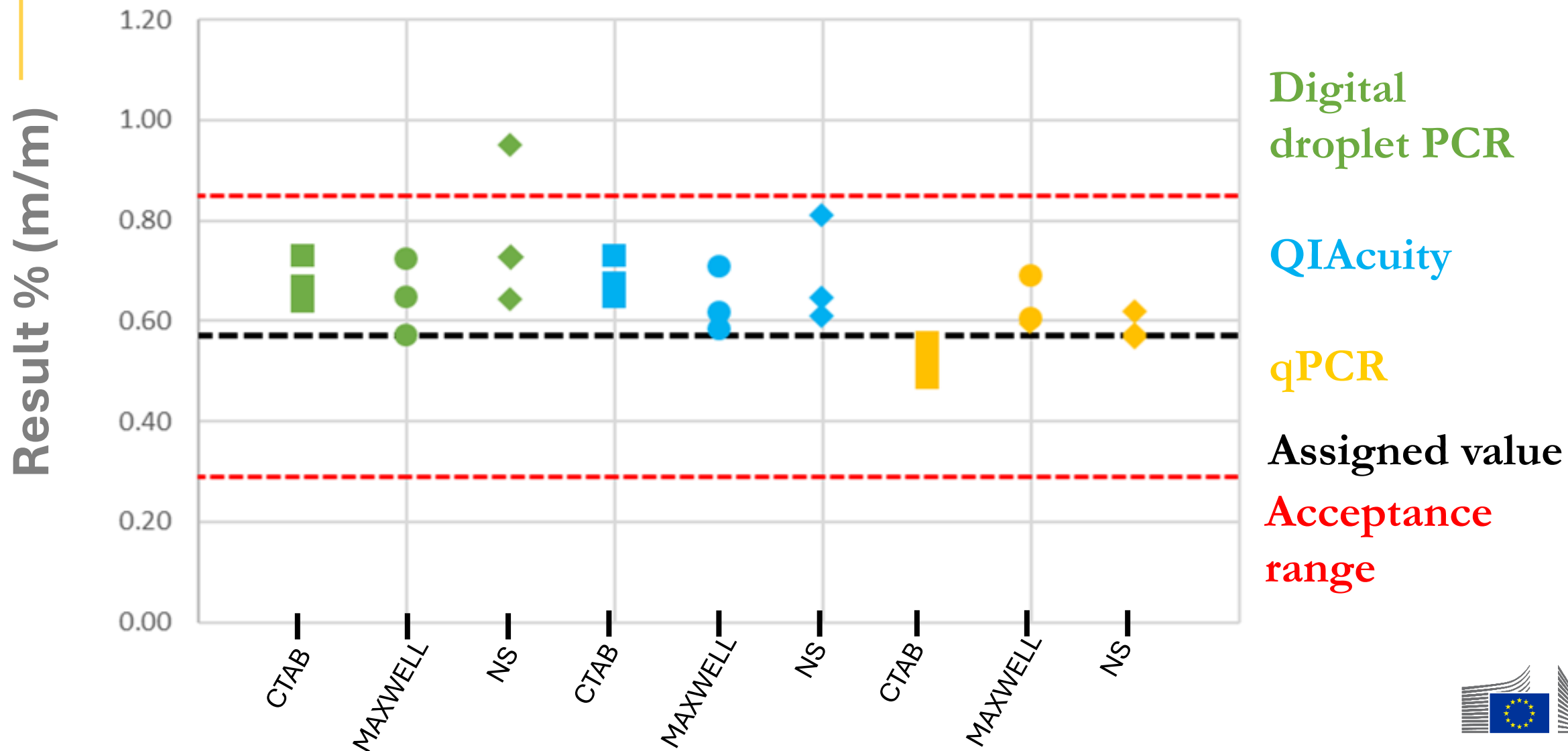
qPCR

Assigned value

Acceptance
range



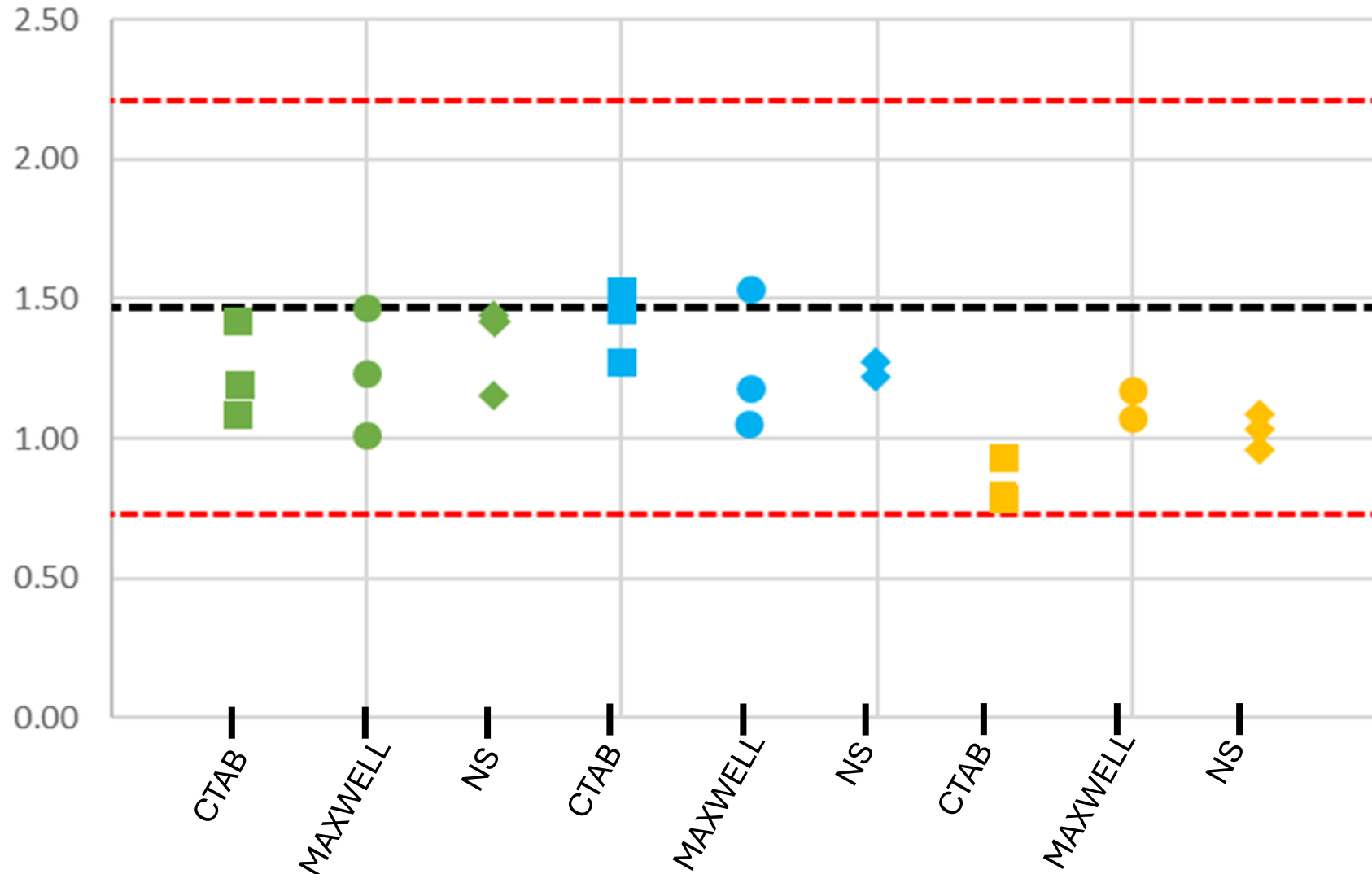
Rapeseed meal (spiked with event MS8)



Meat pâté (spiked with event MON89788)



Result % (m/m)



Digital
droplet PCR

QIAcuity

qPCR

Assigned value

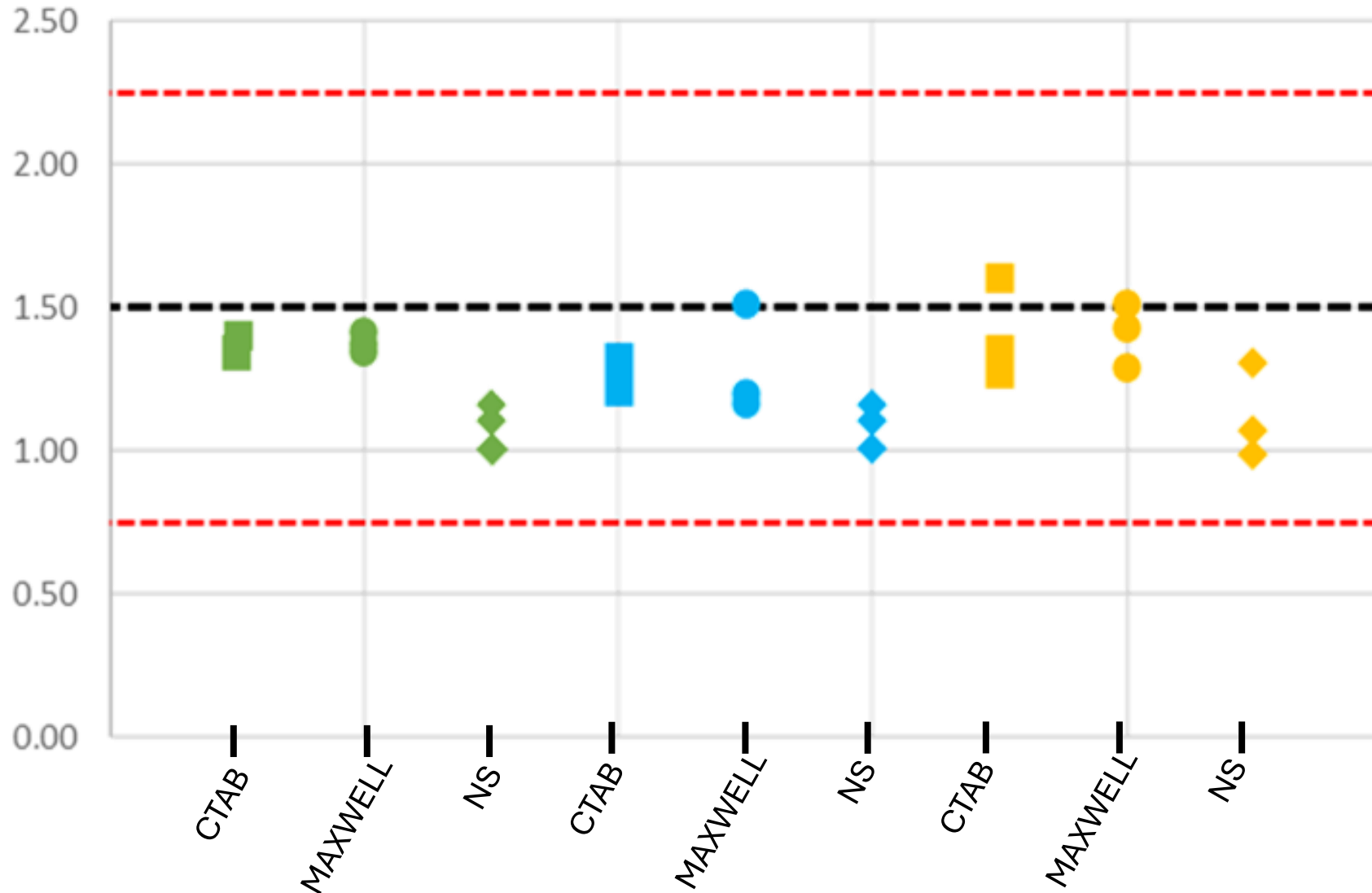
Acceptance
range



Tofu (spiked with event A2704)



Result % (m/m)



Digital
droplet PCR

QIAcuity

qPCR

Assigned value

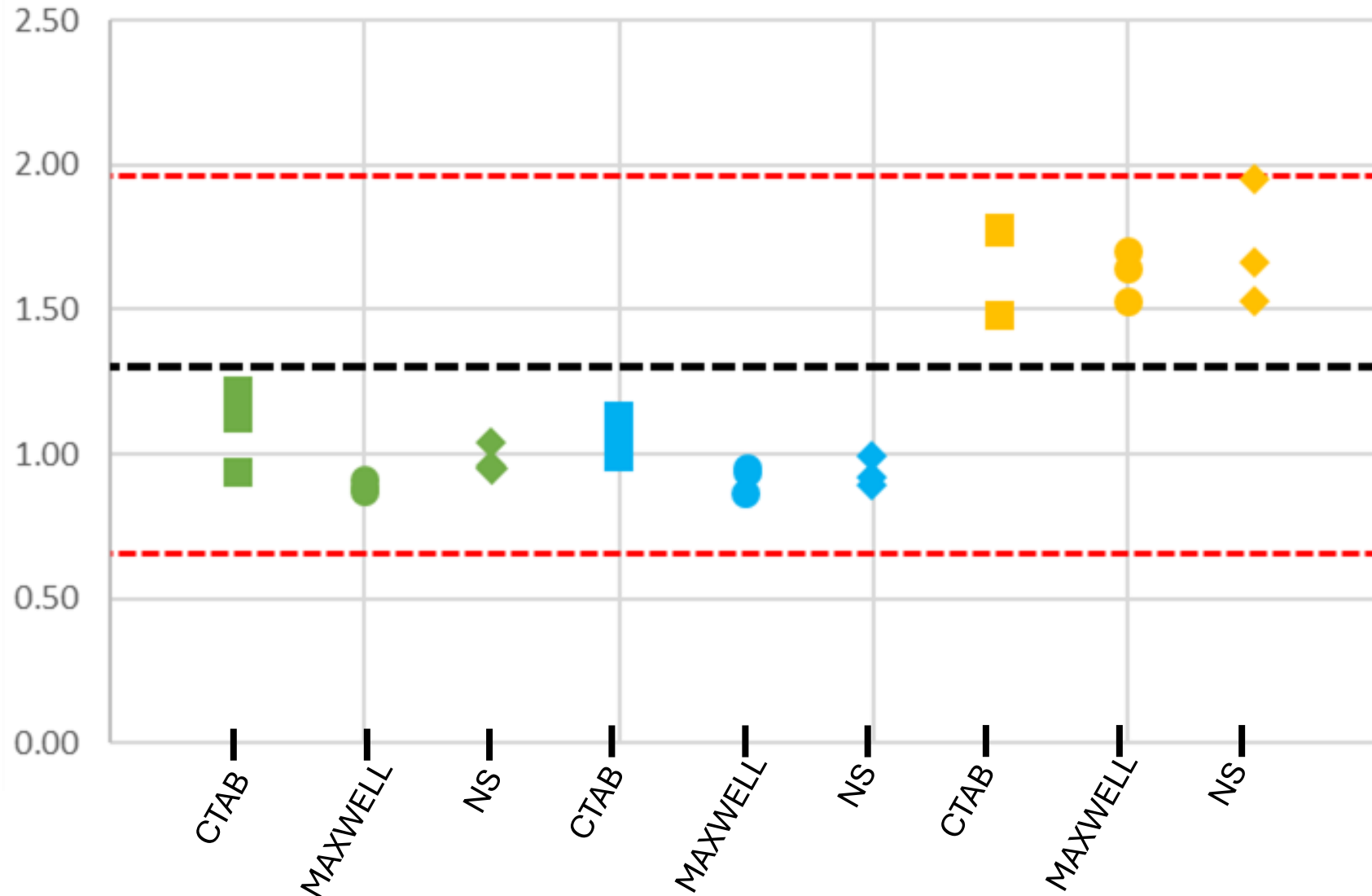
Acceptance
range



Soy protein conc. (event MON87708)



Result % (m/m)



Digital
droplet PCR

QIAcuity

qPCR

Assigned value

Acceptance
range



Conclusiones



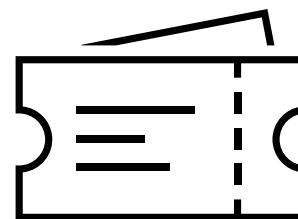
- 1) Diferentes métodos de extracción de ADN generan **variaciones en la cantidad y calidad del ADN extraído** (dependiendo de la matriz; CTAB resultaría especialmente adecuado para matrices difíciles)
- 2) En matrices altamente procesadas, un bajo contenido de ADN bicatenario (dsDNA) **no afecta al análisis posterior por PCR** (en algunos casos, la baja calidad del ADN tiene un efecto limitado)
- 3) En la mayoría de los casos, los resultados de % de GMO obtenidos por qPCR y dPCR en **ambas plataformas son comparables** (aunque requieren mayor investigación en algunos casos, especialmente para matrices complejas)

Dankjulliewel voor jullie attentie!



© European Union 2025

*Invitation a
Geel*



Unless otherwise noted the reuse of this presentation is authorised under the [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license. For any use or reproduction of elements that are not owned by the EU, permission may need to be sought directly from the respective right holders.

